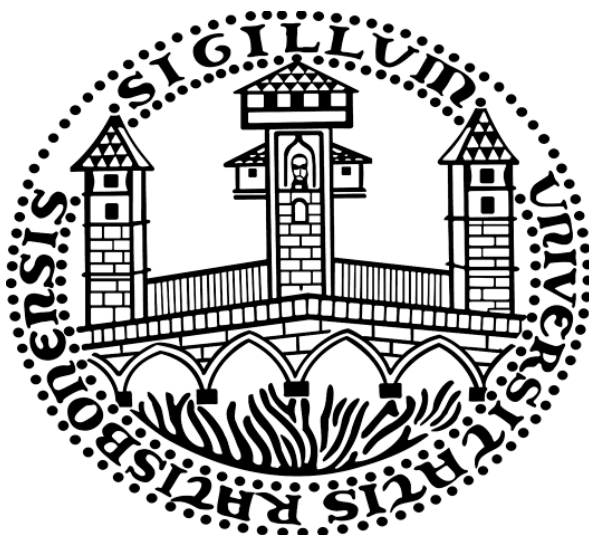


ANALYSE UND MODULATION DES TUMORMETABOLISMUS IN HUMANEN TUMORZELLINIEN UND TUMORGEWEBEN



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER
NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.) DER FAKULTÄT
CHEMIE UND PHARMAZIE DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von:

Michael Kastenberger

aus Kelheim

im November 2010

ANALYSE UND MODULATION DES TUMORMETABOLISMUS IN HUMANEN TUMORZELLINIEN UND TUMORGEWEBEN

Doktorarbeit

von

Michael Kastenberger

Diese Doktorarbeit entstand in der Zeit von Januar 2007 bis November 2010 in der Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie des Universitätsklinikums Regensburg.

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Marina Kreutz.

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Singer^{*}, K., **Kastenberger^{*}, M.**, Gottfried, E., Hammerschmied, C., Büttner, M., Aigner, M., Seliger, B., Walter, B., Schlösser, H., Hartmann, A., Andreesen, R., Mackensen, A. and Kreutz, M. Warburg phenotype in renal cell carcinoma: High expression of glucose-transporter 1 (GLUT1) correlates with low CD8⁺ T cell infiltrate in the tumor. *Int J. Cancer* July (2010). [Epub ahead of print] ^{*} geteilte Erstautorenschaft

Dietl, K., Renner, K., Dettmer, K., Timischl, B., Eberhart, K., Dorn, C., Hellerbrand, C., **Kastenberger, M.**, Kunz-Schughart, L.A., Oefner, P.J., Andreesen, R., Gottfried, E., and Kreutz, M. Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes. *J Immunol.* 184, 3 (Feb. 2010), 1200–9.

Eberhart, K., Renner, K., Ritter, I., **Kastenberger, M.**, Singer, K., Hellerbrand, C., Kreutz, M., Kofler, R. and Oefner, P.J. Low doses of 2-deoxy-glucose sensitize acute lymphoblastic leukemia cells to glucocorticoid-induced apoptosis. *Leukemia.* 23, 11 (Nov. 2009), 2167–70.

Baumann, F., Leukel, P., Doerfelt, A., Beier, C.P., Dettmer, K., Oefner, P.J., **Kastenberger, M.**, Kreutz, M., Nickl-Jockschat, T., Bogdahn, U., Bosserhoff, A.K. and Hau, P. Lactate promotes glioma migration by TGF-beta2-dependent regulation of matrix metalloproteinase-2. *Neuro Oncol.* 11, 4 (Aug. 2009), 368–80.

Gottfried, E., Kunz-Schughart, L.A., Weber, A., Rehli, M., Peuker, A., Müller, A., **Kastenberger, M.**, Brockhoff, G., Andreesen, R. and Kreutz, M. Expression of CD68 in non-myeloid cell types. *Scand J Immunol.* 67, 5 (May 2008), 453–63.

Promotionsgesuch eingereicht am: 3. November 2010

Kolloquiumstermin: 16. Dezember 2010

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Joachim Wegener

Erstgutachter: Prof. Dr. Otto S. Wolfbeis

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Marina Kreutz

Drittprüfer: Prof. Dr. Armin Kurtz

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	Otto Heinrich Warburg: Eine historische Einführung	11
1.2	Die „aerobe Glykolyse“ heute	12
1.3	Molekulare Grundlagen des veränderten Glukosestoffwechsels im Tumor	13
1.4	Dysregulierte Stoffwechselwege im Tumor	16
1.4.1	Veränderungen im Glukosestoffwechsel - Bedeutung für die Tumordiagnostik und Tumorprognose	16
1.4.2	Genetische Regulation der LDHA - Effekte <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	18
1.4.3	Der Aminosäurestoffwechsel	18
1.4.4	Der Lipidstoffwechsel	19
1.5	Pharmakologische Möglichkeiten zur Modulation des Glukosestoffwechsels	19
1.6	Der Effekt von Tumormetaboliten auf das Immunsystem	21
2	Zielsetzung	24
3	Material	25
3.1	Geräte	25
3.2	Verbrauchsmaterial	26
3.3	Chemikalien, Kits und Reagenzien	26
3.4	Plasmide	28
3.5	Antikörper für Western-Blot	29
3.6	Oligonukleotide	30
3.6.1	RT-qPCR-Primer für humane Sequenzen	30
3.6.2	RT-qPCR-Primer für murine Sequenzen	31
3.7	Bakterienstämme	32
3.8	Tumorzelllinien	32
3.9	Patientenmaterial	32

3.10 Mäuse	33
3.11 Software	33
4 Methoden	34
4.1 Mikrobiologische Methoden	34
4.1.1 Anzucht und Kultur von Bakterien	34
4.1.2 Transformation von <i>E. coli</i>	35
4.1.3 Glycerin-Stocks	35
4.1.4 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	35
4.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen	35
4.2 Molekularbiologische Methoden	35
4.2.1 Methoden der RNA-Isolierung	35
4.2.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	36
4.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
4.2.4 Klonieren von PCR-Produkten	43
4.2.5 Restriktionsverdau	43
4.2.6 Agarosegelelektrophorese	44
4.2.7 Aufreinigung von DNA per Gelextraktion	45
4.2.8 Sequenzierung	45
4.3 Proteinbiochemische Methoden	45
4.3.1 Proteinlysate in RIPA-Puffer	46
4.3.2 Proteinbestimmung	46
4.3.3 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
4.3.4 Western-Blot	48
4.3.5 Tissuearray	50
4.4 Zellbiologische Methoden	50
4.4.1 Zellkultur	50
4.4.2 Mykoplasmen-Test	52
4.4.3 Transfektionen	52
4.4.4 Klonierung und Subklonierung von transfizierten Zelllinien	53
4.4.5 ³ H-Thymidin Assay (Proliferationstest)	53
4.4.6 Laktatmessung in Zellkulturüberständen	54
4.4.7 O ₂ - und pH-Kinetik mit dem SDR SensorDish®-Reader	54

5	Ergebnisse	56
5.1	Immunsuppressive Effekte von Laktat auf Immunzellen	56
5.2	Effekte von Laktat auf Tumorzellen	57
5.3	Metabolische Charakterisierung von humanen Tumorzelllinien und primärem Tumormaterial	57
5.3.1	Der „Warburg-Effekt“ in humanen Tumorzelllinien	58
5.3.2	Analyse der Laktatdehydrogenase A und B sowie der Laktattransporter MCT1 und MCT4 in humanen Tumorzelllinien	59
5.3.3	Analyse verschiedener Enzyme der oxidativen Phosphorylierung in humanen Tumorzelllinien	60
5.3.4	Messung des Sauerstoffverbrauchs humaner Tumorzelllinien mittels SDR SensorDish®-Reader	61
5.3.5	Analyse des Aminosäurestoffwechsels in humanen Tumorzelllinien	62
5.3.6	Untersuchung des Prostaglandinstoffwechsels in humanen Tumorzelllinien	63
5.3.7	Vergleichende Analyse von Tumorzelllinien und nicht-transformierten Zellen	64
5.3.8	Analyse des Warburg-Effekts und des Glukosemetabolismus in Biopsien und Schnitten	65
5.4	Pharmakologische Modulation des Glukosestoffwechsels	72
5.4.1	Modulation der Laktatproduktion durch Glykolyseinhibitoren und deren Auswirkung auf die Proliferation bei humanen Melanomzelllinien	73
5.4.2	Effekt der Kombination von 2-Deoxy-D-Glukose mit Dexamethason auf die Proliferation von humanen Leukämiezellen	74
5.5	Genetische Modulation des Glukosestoffwechsels	75
5.5.1	Stabile Herunterregulation der Laktatdehydrogenase A auf mRNA- und Protein-Ebene - Effekte auf die Laktatproduktion in der humanen Melanomzelllinie MelIm	75
5.5.2	Stabile Herunterregulation der Laktatdehydrogenase A auf mRNA-Ebene und Protein-Ebene - Effekte auf die Laktatproduktion in der murinen Melanomzelllinie B16.SIY E12	78
5.5.3	Proliferation der genetisch veränderten, murinen B16.SIY E12-Zellen	79
5.6	Wachstum der genetisch veränderten Klone <i>in vivo</i>	80
5.6.1	Laktatsekretion und Proliferationsverhalten von murinen Subklonen <i>in vitro</i>	80

5.6.2	Subkutane Injektion von murinen B16.SIY E12-Zellen mit einer verringerten Laktatsekretion in C57/BL6-Mäuse	81
5.6.3	Subkutane Injektion von murinen B16.SIY E12-Zellen mit einer verringerten Laktatsekretion in Rag1 ^{-/-} -Mäuse	83
6	Diskussion	85
6.1	Metabolische Charakterisierung von humanen Tumorzelllinien und primärem Tumormaterial	85
6.1.1	Glukosemetabolismus und Atmung in Tumorzelllinien, untransformierten Zellen entsprechender Gewebe und Immunzellen	85
6.1.2	Untersuchung des Aminosäure- und Lipidstoffwechsels	88
6.1.3	Der Glukosemetabolismus in Tumorbiopsien und Normalgewebe	89
6.2	Pharmakologische und genetische Modulation des Glukosestoffwechsels	92
6.3	Verhalten genetisch veränderter B16.SIY E12-Klone <i>in vivo</i>	95
7	Zusammenfassung und Ausblick	97
8	Summary and conclusions	99
9	Literaturverzeichnis	101
10	Abkürzungsverzeichnis	117
11	Danksagung	121
12	Curriculum Vitae	122

Abbildungsverzeichnis

1.1	Otto Warburg	11
1.2	Der Warburg-Phänotyp: Aerobe Glykolyse in Tumorzellen	12
1.3	Molekulare Grundlagen des Tumormetabolismus	14
3.1	pCR®2.1-TOPO	28
3.2	pGeneClip hMGFP	28
3.3	pGene/V5-His	29
4.1	RNA-Titration für RT-PCR bzw. RT-qPCR	37
4.2	Prinzip der RT-qPCR	41
4.3	Berechnung der Effizienz aus der Steigung	43
4.4	Schematischer Aufbau einer Western-Blot-Kammer	49
4.5	Neubauer-Zählkammer	51
4.6	PreSens-Technologie	54
5.1	Milchsäure inhibiert die TNF-Sekretion in Monozyten.	56
5.2	Milchsäure reguliert die TGF- β 2-mRNA.	57
5.3	mRNA-Expression von Glukosetransportern in humanen Tumorzelllinien	58
5.4	mRNA-Expression von Laktatdehydrogenase A und B in humanen Tumorzelllinien	59
5.5	mRNA-Expression von Laktattransportern in humanen Tumorzelllinien	60
5.6	mRNA-Expression der Pyruvatdehydrogenase und Malatdehydrogenase in huma- nen Tumorzelllinien	60
5.7	Sauerstoffverbrauch und pH-Änderung während der Kultur von humanen Tumor- zelllinien	61
5.8	mRNA-Expression verschiedener Enzyme des Arginin- und Tryptophanstoffwech- sels in humanen Tumorzelllinien und Immunzellen	62
5.9	mRNA-Expression der Cyclooxygenasen COX1 und COX2 in humanen Tumorzell- linien und Immunzellen	63

5.10 Vergleichende Untersuchung der Expression von GLUT1, LDHA und MCT1 sowie der Laktatsekretion in Tumorzelllinien, Immunzellen und entsprechenden Primärzellen	65
5.11 mRNA-Expression Glukosemetabolismus-assoziierter Gene im Urothelkarzinom . . .	66
5.12 mRNA-Expression Glukosemetabolismus-assoziierter Gene im HCC	67
5.13 mRNA-Expression Glukosemetabolismus-assoziierter Gene im RCC	68
5.14 Korrelation zwischen GLUT1 und LDHA bzw. GLUT1 und MCT1 mRNA-Expression	68
5.15 mRNA-Expression von Aminosäuremetabolismus-assozierten Genen im RCC . . .	69
5.16 mRNA-Expression der Cyclooxygenasen COX1 und COX2 im RCC	70
5.17 mRNA-Expression von myeloiden Immunzellmarker-Genen im RCC	70
5.18 mRNA-Expression von T-Zellmarker-Genen im RCC	71
5.19 Inverse Korrelation zwischen GLUT1-Expression und der Anzahl CD8 ⁺ T-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom in „Tissuemicroarrays“	72
5.20 Inhibition der Laktatsekretion und Proliferation durch Glykolyseinhibitoren	73
5.21 GLUT1 mRNA-Expression in ALL Zelllinien nach Behandlung mit Dexamethason und 2-Deoxy-D-Glukose.	74
5.22 Expression der LDHA in shLDHA-transfizierten Mellm-Klonen	76
5.23 Regulation der LDHA und LDHB auf mRNA- und Protein-Ebene in ausgewählten Mellm-Klonen	77
5.24 Laktatsekretionsverhalten der Mellm Subklone über mehrere Passagen hinweg . .	78
5.25 Regulation der LDHA und LDHB auf mRNA- und Protein-Ebene in ausgewählten B16.SIY E12-Klonen	79
5.26 Bestimmung der Proliferationsrate von B16.SIY E12-Klonen	80
5.27 Laktatsekretion und Proliferation der B16.SIY E12-Subklone #2I/c und n.k. #a/c	81
5.28 Wachstumsverhalten der B16.SIY E12-Subklone #2I/c und n.k. #a/c in C57/BL6-Mäusen	82
5.29 Wachstumsverhalten der B16.SIY E12-Subklone #2I/c und n.k. #a/c in Rag1 ^{-/-} -Mäusen	83

Tabellenverzeichnis

1.1	Isoenzyme der Laktatdehydrogenase	16
3.1	Geräte	26
3.2	Verbrauchsmaterial	26
3.3	Chemikalien, Kits und Reagenzien	27
3.4	Antikörper	29
3.5	RT-qPCR-Primer für humane Sequenzen	31
3.6	RT-qPCR-Primer für murine Sequenzen	31
3.7	Bakterienstämme	32
3.8	Zelllinien	32
3.9	Patientenmaterial	33
3.10	Mausstämme	33
3.11	Software	33
4.1	Agarosegelkonzentration bezüglich der DNA-Fragmentgröße	44
5.1	Tumoranwachsrates in C57/BL6-Mäusen	82
10.1	Abkürzungen	120

1 Einleitung

1.1 Otto Heinrich Warburg: Eine historische Einführung

Der Chemiker, Arzt und Physiologe Otto Heinrich Warburg (Abb. 1.1) wurde am 8. Oktober 1888 in Freiburg i. Br. geboren und zählt mit zu den wichtigsten Köpfen der Biochemie im 20. Jahrhundert.



Abbildung 1.1: Otto Warburg

Er studierte Chemie in Freiburg und Berlin und setzte seine Ausbildung mit einem Medizinstudium in Berlin, München und Heidelberg fort. 1914 wurde Otto Heinrich Warburg zum Mitglied der Kaiser-Wilhelm-Gesellschaft ernannt. 3 Jahre später wurde er zum Professor an der Friedrich-Wilhelms-Universität Berlin berufen. 1930 gründete Warburg das Kaiser-Wilhelm-Institut für Zellphysiologie und blieb dort Direktor bis 1967. In seinen Forschungen widmete er sich der Photosynthese, der Krebsforschung und der biologischen Energieübertragung. Mit der Entdeckung der Cytochromoxidase entschlüsselte er 1926 den Mechanismus der Zellatmung und erhielt dafür 1931 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie. Ein weiterer Meilenstein in Warburgs Forschung waren seine Arbeiten und Publikationen zum Stoffwechsel von Tumoren [121]. Dabei entdeckte er, dass Tumore ungewöhnlich hohe Mengen an Laktat sezernieren. Diese Beobachtung erklärte sich Warburg 1930 mit der sogenannten „Warburg-Hypothese“, die besagt, dass Tumorzellen ihre Energie primär durch Umwandlung von Pyruvat zu Laktat gewinnen und nicht durch Oxidation mit Hilfe von Sauerstoff. Da die Tumorzellen diese Art der Energiegewinnung auch in Anwesenheit von Sauerstoff nutzen, wird dieses Phänomen auch als „aerobe Glykolyse“ bezeichnet. Als Ursache für seine Hypothese postulierte Warburg eine gestörte Funktion der Mitochondrien in Tumorzellen, was für ihn auch die grundlegende Ursache von Krebs war (Abb. 1.2).

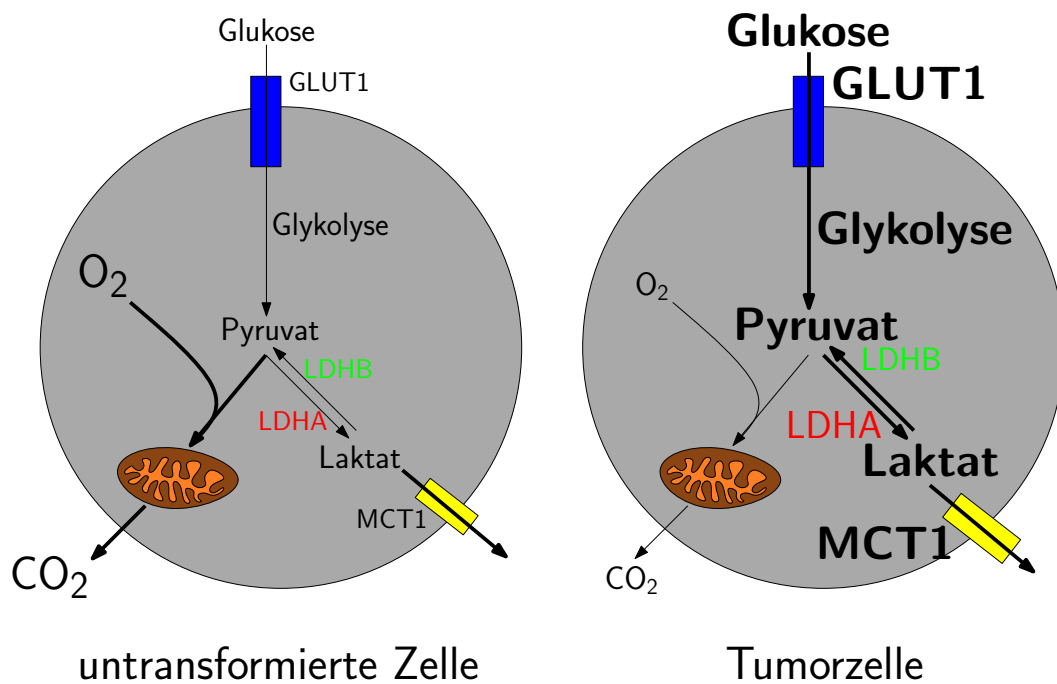


Abbildung 1.2: **Der Warburg-Phänotyp: Aerobe Glykolyse in Tumorzellen.** Nach Aufnahme über den Glukosetransporter GLUT1 wird die Glukose in der Glykolyse zu Pyruvat verstoffwechselt. In untransformierten Zellen wird Pyruvat in die Mitochondrien geschleust, wo es mit Hilfe von O_2 in der oxidativen Phosphorylierung zur ATP-Synthese verwendet wird. Tumorzellen generieren ATP überwiegend in der Glykolyse. Dabei entstehendes Laktat wird über den Monocarboxylattransporter MCT1 aus der Zelle ausgeschleust.

1.2 Die „aerobe Glykolyse“ heute

Obwohl es nun schon ca. 80 Jahre zurück liegt, dass Otto Heinrich Warburg Veränderungen im Energiestoffwechsel von Tumoren feststellte, ist dieses Gebiet immer noch ein zentrales Thema wissenschaftlicher Studien und Diskussionen. Die Warburg-Hypothese ist dabei bis heute weder eindeutig bewiesen noch widerlegt worden. In den letzten Jahrzehnten erweckte das Thema erneut das Interesse der Öffentlichkeit durch zahlreiche Publikationen, die sich für und gegen die Warburg-Hypothese aussprachen.

Für die Hypothese spricht unter anderem eine Veröffentlichung von Schulz et al. [102]. Die Gruppe überexprimierte Frataxin, ein mitochondriales Protein, in Kolonkarzinomzellen. Die Tumorzellen zeigten daraufhin eine erhöhte Respirationsrate und ein erhöhtes mitochondriales Membranpotential. Hierdurch kam es zu verringerten Proliferationsraten *in vitro* und zu einer geringeren Fähigkeit zur Tumorbildung nach Injektion in Mäuse. Das heisst, eine Normalisierung der Respiration führt zu einer Normalisierung der Proliferation. Entsprechend zeigten Untersuchungen von Kiebish et al., dass die Cardiolipinstruktur in Mitochondrien der Gehirntumore von Mäusen eine andere Zusammensetzung im Vergleich zu entsprechenden untransformierten Zellen hatte, was

zu Störungen in der Elektronentransportkette führte [56]. Dieses Phospholipid ist auf der inneren Mitochondrienmembran zu finden und beeinflusst die Bioenergetik und Funktion der Mitochondrien.

Auf der anderen Seite gibt es auch zahlreiche Untersuchungen, die gegen die Warburg-Hypothese sprechen. So wurde eine aerobe Laktatproduktion auch in einigen normalen Geweben gefunden. In Erythrozyten ist dies sogar die einzige Möglichkeit zur Energiegewinnung, da diese keine Mitochondrien besitzen [19]. Außerdem zeigen auch nicht alle Tumore eine hohe glykolytische Aktivität, wie z.B. langsam wachsende Morris-Hepatom-Zellen [100]. Weinhouse et al. stellten zudem in isolierten Mitochondrien von Tumorzellen normale P/O-Quotienten und die Fähigkeit zur Oxidation fest [124]. Pederson et al. konnten zeigen, dass die Mitochondrien von Tumoren in Anzahl und Morphologie im Vergleich zu Normalgewebe zwar deutlich variierten, die Respirationsrate dieser Tumore aber vergleichbar mit der von Normalgeweben war [85]. Somit zeigen diese Arbeiten, dass die gesteigerte Glykolyse nicht zwangsläufig auf einer verminderten Respiration beruht.

Vander Heiden et al. sehen als Ursache für die aerobe Glykolyse keine irreversible Störung der Mitochondrien sondern eine Anpassung an die erhöhte Proliferation [45]. Die Energieproduktion über Glykolyse ist laut Heiden zwar ineffizienter, aber schneller. Dazu beschreiben DeBerardinis et al., dass glykolytische Tumorzellen ein hohes ATP/ADP-Verhältnis, vergleichbar mit dem von oxidativen Zellen, zeigen [24]. Die hohe Glykolyserate entlastet die Mitochondrien, die hierdurch verstärkt Nukleotide, Aminosäuren usw. durch die anaplerotische Funktion des Zitratzyklus produzieren können [45]. Somit wäre die gesteigerte Glykolyse nicht durch irreversible Defekte in der Atmungskette zu erklären, sondern mehr als eine metabolische Anpassung der Tumorzelle zu sehen.

1.3 Molekulare Grundlagen des veränderten Glukosestoffwechsels im Tumor

Wie bisher dargestellt, zeigen Tumore Veränderungen in zahlreichen Stoffwechselwegen. Dies wirft die Frage nach der Ursache dieser Umstellung auf. Die metabolische Reorganisation des Tumors könnte eine Reaktion auf ein verändertes Mikromilieu sein, da viele Tumore ein hypoxisches Milieu aufweisen. Aber wie ist damit die hohe Glykolyseaktivität in Lungentumoren [82] und Leukämien [42, 34] zu erklären? Eine Vielzahl von genetischen Veränderungen führt zu einem verstärkten Glukosemetabolismus (Abb. 1.3). Außerdem reguliert die Hypoxie im Tumor über HIF-1 α verschiedene Gene.

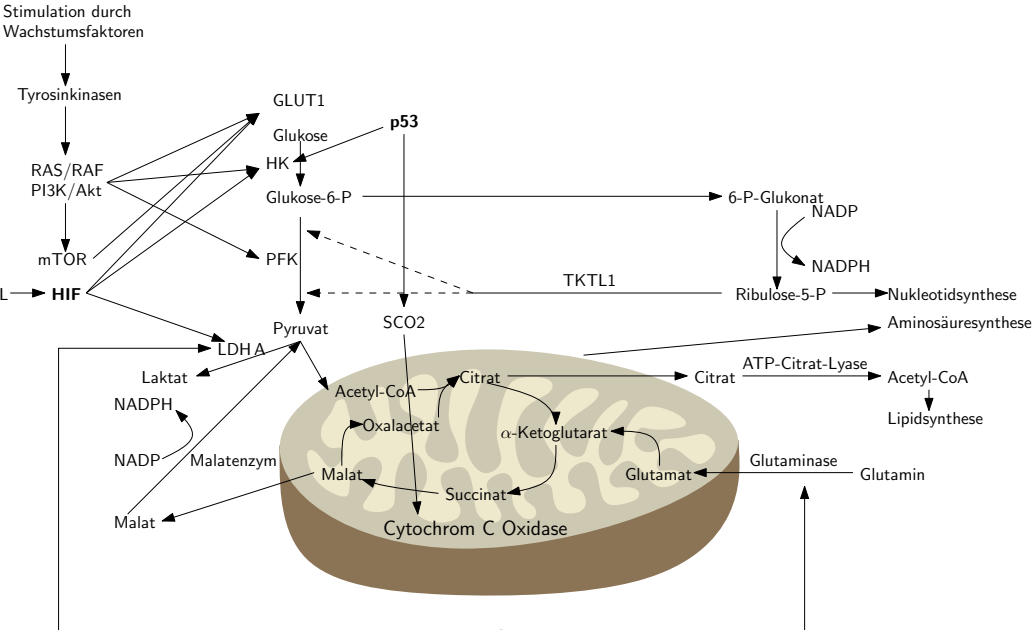


Abbildung 1.3: **Molekulare Grundlagen des Tumormetabolismus.** Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen regulieren wichtige Stoffwechselwege im Tumor. Tumore haben einen erhöhten Bedarf an Energie und Makromolekülen für Nukleotid-, Aminosäure- und Lipidsynthese. Deshalb sind besonders Glykolyse und Glutaminolyse hochreguliert.

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 α steht im Zentrum eines komplexen Netzwerkes. Ein hypoxisches Milieu, wie es im Tumor oft vorzufinden ist, stabilisiert den Transkriptionsfaktor, der die Expression von ca. 70 Genen reguliert. Diese sind unter anderem in Glukoseaufnahme, Glykolyse, Laktatproduktion, pH-Regulation und Angiogenese involviert [2]. Unter normoxischen Bedingungen wird der Transkriptionsfaktor an Prolinresten von Prolylhydroxylasen hydroxyliert. Dies führt zu einer Ubiquitinylierung durch den Tumorsuppressor von Hippel-Lindau (VHL) und zur Degradation von HIF-1 α . Im klarzelligen Typ des Nierenzellkarzinoms ist VHL häufig mutiert, was zu einer konstitutiven HIF-1 α -Expression führt [104]. Auch bei Hypoxie können die Prolinreste nicht mehr hydroxyliert werden und es kommt zu einer konstitutiven HIF-1 α -Expression. HIF-1 α dimersiert nun mit HIF-1 β und verbindet sich mit p300 zu einem Komplex, der im Zellkern die entsprechenden Gene reguliert. Weiterhin wird HIF-1 α durch die Succinatdehydrogenase, die Fumaratdehydrogenase und reaktive Sauerstoffspezies stabilisiert [50, 92, 103].

Insgesamt ist heute klar, dass eine Vielzahl von Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen regulierend in den Glukosemetabolismus eingreifen. Die bekannteste Veränderung, die im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen steht, ist die Mutation des Tumorsuppressors und Transkriptionsfaktors P53. Mutationen im *P53*-Gen treten im Kolonkarzinom [48], im Brustkarzinom [53, 66] und im Lungenkarzinom auf [52]. Der Transkriptionsfaktor ist entscheidend in Zellzyklus-

und Apoptosevorgänge involviert [111]. Darüber hinaus greift P53 auch in den Glukosestoffwechsel der Zelle ein. Mathupala et al. konnten zeigen dass das Hexokinase 2-Gen am Promotor eine Bindestelle für P53 aufweist [76]. Indirekt reguliert der Transkriptionsfaktor auch die Balance zwischen Glykolyse und mitochondrialer Respiration. Matoba et al. identifizierten „Synthesis of Cytochrome C-Oxidase 2“ (SCO2), ein wichtiger Regulator der Cytochrom C-Oxidase, als ein von P53 reguliertes Gen [77]. Ein Ausschalten dieses Gens in humanen Tumorzellen mit Wildtyp *P53* hatte eine Umstellung auf einen glykolytischen Phänotyp, wie man ihn in Tumorzellen mit mutiertem *P53* findet, zur Folge.

Ein wichtiges Onkogen ist *C-MYC*. Dieser Transkriptionsfaktor ist an der Zellzyklusregulation beteiligt und häufig in Lymphomen mutiert [109]. *C-MYC* reguliert auch Glukosemetabolismus-assoziierte Gene wie die Laktatdehydrogenase A (*LDHA*), den Glukosetransporter 1 (*GLUT1*), die Hexokinase 2 und die Phosphofruktokinase [20]. Darüber hinaus aktiviert *C-MYC* die Glutaminolyse. Damit ist der Eintritt von Glutamin über Glutamat und α -Ketoglutarat in den Zitratzyklus gewährleistet [125].

Weitere Onkogene, die in den Glukosestoffwechsel eingreifen, sind *KRAS* und *BRAF*. Mutationen in *KRAS* findet man häufig im Kolonkarzinom, Pankreaskarzinom und im Lungenkarzinom [127] während *BRAF*-Mutationen vielfach im Melanom vorkommen [127]. *KRAS* aktiviert *BRAF*, welches wiederum zur Aktivierung des MAPK/ERK-Signaltransduktionsweges führt. Hierdurch wird die Transkription vieler Gene reguliert, die Zellzyklus und Proliferation kontrollieren (*FOS*, *C-JUN*, Cycline) [30]. Yun et al. konnten zeigen, dass *KRAS* neben der Regulation des Zellzyklus auch den Glukosemetabolismus moduliert [127]. In seinen Untersuchungen fand er in Tumorzellen mit mutiertem *KRAS* eine erhöhte *GLUT1*-Expression. Darüber hinaus kann *KRAS* den Glukosemetabolismus auch noch über die Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B-Signalweges (PI3K/AKT) modulieren. AKT reguliert hierbei die Expression von Glukosetransportern, der Hexokinase, der Phosphofruktokinase und der Laktatdehydrogenase [34].

Abschließend zeigt sich, dass ein verändertes Mikromilieu, wie Hypoxie nur *eine* Ursache für einen veränderten Tumormetabolismus darstellt. Weitere Ursachen liegen in der Mutation von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. Das Zusammenspiel von verschiedenen Faktoren im Tumormilieu, wie Hypoxie und die Expression bzw. Mutation/Deletion bestimmter Onkogene und Tumorsuppressorgene, bestimmt somit den metabolischen Phänotyp.

1.4 Dysregulierte Stoffwechselwege im Tumor

1.4.1 Veränderungen im Glukosestoffwechsel - Bedeutung für die Tumordiagnostik und Tumorprognose

Viele Tumore zeichnen sich durch eine Hochregulation verschiedener Glykolyse-assoziiierter Gene, die Glukosetransporter, Hexokinase, Pyruvatkinase, Laktatdehydrogenase und Monocarboxylat-transporter codieren, aus. Da die Glykolyse nur einen Bruchteil der Energie liefert (2 ATP), die durch Oxidation entstehen würde (36 ATP), zeigen Tumore einen erhöhten Glukoseumsatz, um ihren Energiebedarf zu decken. Die erhöhte Expression von Glukosetransportern (GLUT1, GLUT3) wird seit langem in der medizinischen Diagnostik genutzt [13]. Die Positronen-Emissions-Tomographie mit ^{18}F -fluoro-2-Deoxy-D-Glukose (^{18}F -2-DG) ist eine etablierte Methode zur Detektion, Diagnose und Wachstumskontrolle von Tumoren [96]. Da Tumorzellen diese nicht verstoffwechselbare Substanz anreichern, lassen sich hoch glykolytische Tumore von normalem Gewebe abgrenzen.

Eine Überexpression der Hexokinase 2 als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym der Glykolyse korreliert bei Gehirnmetastasen von Brustkrebspatienten mit einer schlechten Prognose [84]. Die Pyruvatkinase ist im Tumor als M2-Isoform überexprimiert und begünstigt invasives Tumorstadium [17].

Auch eine erhöhte Expression der Laktatdehydrogenase (LDH) begünstigt das Tumorstadium. Für die LDH gibt es 3 Gene, *LDHA*, *LDHB* und *LDHC* [71]. Diese codieren verschiedene Untereinheiten aus denen sich die 5 Isoenzyme zusammensetzen (Tab. 1.1). *LDHC* wird nur während der Embryonalentwicklung exprimiert.

Isoenzym	Untereinheiten
LDH-1	4 × LDHB
LDH-2	3 × LDHB / 1 × LDHA
LDH-3	2 × LDHB / 2 × LDHA
LDH-4	1 × LDHB / 3 × LDHA
LDH-5	4 × LDHA

Tabelle 1.1: **Isoenzyme der Laktatdehydrogenase.** Dargestellt ist die Zusammensetzung der 5 Isoenzyme der Laktatdehydrogenase. Die Untereinheiten werden von den Genen *LDHA* und *LDHB* codiert.

In glykolytischen Tumoren ist insbesondere die LDH-5, bestehend aus 4 LDHA-Untereinheiten, erhöht. Dieses Isoenzym katalysiert die Umsetzung von Pyruvat zu Laktat und ist unter physiolo-

gischen Bedingungen hauptsächlich in Leber- und Skelettmuskulatur exprimiert.

Koukourakis et al. analysierten die Expression von LDH-5 immunhistochemisch im kolorektalen Adenokarzinom. Dabei fanden sie eine Korrelation zwischen deren Überexpression und schlechter Überlebensrate der Patienten [63]. Auch im Lungenkarzinom konnten Koukourakis et al. eine erhöhte Expression der LDH-5 finden, die wiederum mit der Tumoraggressivität und schlechter Prognose korrelierte [62]. Dies spiegelte sich auch in den erhöhten LDH-Konzentrationen im Serum der Patienten wieder [62],[64]. Giannoulaki et al. konnten diese Ergebnisse bei der Analyse der LDH-Spiegel im Serum von Tumorpatienten bestätigen [38]. Im Gegensatz zur LDH-5-Expression in Tumorzellen wurde in Tumor-assoziierten Fibroblasten eine verstärkte LDH-1-Expression gefunden [60, 61]. Die LDH-1 katalysiert die Umwandlung von Laktat zu Pyruvat. Dadurch könnten diese Stromazellen das von Tumorzellen sezernierte Laktat aufnehmen und oxidativ verstoffwechseln.

Zum Nachweis von Laktat im Tumor entwickelten Müller-Klieser et al. eine Biolumineszenztechnik. Dabei fanden sie im Kolonkarzinom, im Cervixkarzinom sowie in Tumoren im Kopf- und Halsbereich deutlich erhöhte Laktatmengen, die mit Metastasierung und schlechter Prognose korrelierten [99, 118, 120]. Walenta et al. fanden hier Laktatkonzentrationen zwischen 8 und 40 $\mu\text{mol/g}$ in Tumorbiopsien [119], die mit Metastasierung korrelierten.

Eine Ausschleusung des Laktats über die Monocarboxylattransporter (MCTs) ist für die pH-Homöostase der Tumorzelle von entscheidender Bedeutung [43]. MCT1 ist in Lymphomen, im Kolonkarzinom [61], in Melanomen [117] und Lungenkarzinom [60] überexprimiert. Die Suppression von MCT1 führt *in vitro* zu einem verminderten Proliferationsverhalten [78].

Neben der Glykolyse spielt auch der Pentosephosphatweg (PPP) als Lieferant für Ribosen und Reduktionsäquivalenten (NAPDH) für anabole Vorgänge eine wichtige Rolle im Glukosemetabolismus des Tumors. Häufig findet man in Tumoren eine Überexpression der Transketolase-like-1 (TKTL1), einer von 3 Transketolasen (TKT, TKTL1, TKTL2), die im nicht-oxidativen Teil des PPP eine entscheidende Rolle spielen [67, 128].

Neben der Überexpression von Genen der Glykolyse wirken sich auch mitochondriale Defekte, die schon Warburg als Ursache für die aerobe Glykolyse postulierte, auf den Glukosemetabolismus im Tumor aus. Häufig manifestieren sich derartige Mutationen in den Atmungskomplexen I und III, bzw. der β -Untereinheit der β -F1-ATPase in Nieren-, Brust- und Kolonkarzinomen [98].

1.4.2 Genetische Regulation der LDHA - Effekte *in vitro* und *in vivo*

Mehrfach konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der LDH *in vitro* und *in vivo* in der Maus zu einer verminderten Proliferation führt. *In vitro* konnten Fantin et al. zeigen, dass eine Herunterregulation der LDHA per siRNA in Mammakarzinomzelllinien die oxidative Phosphorylierung stimuliert [35]. Damit geht besonders unter Hypoxie eine verminderte Proliferation und Migration einher. Bestätigt wurden diese Ergebnisse von Xie et al., der in Nierenkarzinomzelllinien die überexprimierte LDHA per siRNA herunterregulierte [126], was ebenfalls eine Wachstumsinhibition zur Folge hatte. *In vivo* zeigte sich hier bei Injektion dieser Zelllinien in immundefiziente Mäuse auch unter Normoxie eine Wachstumsinhibition im Vergleich zu Kontrollen. Le et al. inhibierten die LDHA mit siRNA und „small-molecule“-Inhibitoren in B-Lymphom-Zelllinien. Sie fanden *in vitro* eine erhöhte Radikalbildung, hervorgerufen durch Umstellung von Glykolyse auf oxidative Phosphorylierung, als Ursache für diese Proliferationsinhibition [69].

1.4.3 Der Aminosäurestoffwechsel

Stark proliferierende Zellen sind neben Glukose primär von Glutamin abhängig. Als häufigste Aminosäure im Körper fungiert Glutamin als Haupt-Stickstoff-Gruppendonator in der Synthese von Makromolekülen wie z.B. Nukleotiden und Aminosäuren. In der Glutaminolyse wird Glutamin durch die Glutaminase zu Glutamat und anschließend zu α -Ketoglutarat umgewandelt, wodurch es in den Zitratzyklus eintreten kann. Das eingeschleuste α -Ketoglutarat kann über Malat zu Pyruvat und Laktat umgewandelt werden, wobei ein Reduktionsäquivalent in Form von NADPH/H⁺ entsteht. Da der Tumor seinen Energiebedarf primär durch „aerobe Glykolyse“ deckt, hat der Zitratzyklus eine anaplerotische Funktion in der Synthese von Makromolekülen wie Aminosäuren, Lipiden und Nukleotiden, bei der Glutamin den Stickstoff liefert [23]. Entsprechend zeigen Tumorzellen eine gesteigerte Glutaminase-Expression und erhöhte Glutaminaufnahme. Außerdem wurde in Tumorpatienten eine erniedrigte Glutaminkonzentration, jedoch eine erhöhte Glutamatkonzentration im Serum festgestellt [3].

Neben Glutamin spielen auch Tryptophan und Arginin eine wichtige Rolle im Aminosäurestoffwechsel des Tumors. Tryptophan wird im ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Abbaureaktion von der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) zu Kynurenin umgewandelt. Der Mensch besitzt 2 IDO-Isoenzyme, IDO1 und IDO2 [72, 73]. Ein wichtiges Beiprodukt dieser Reaktion ist NAD, ein bedeutender Kofaktor bei Redoxvorgängen im Energie- und Glukosestoffwechsel der Zelle [55]. Besonders im Melanom-, Kolon- und Nierenzellkarzinom findet man eine erhöhte Expression der IDO, was zu einer Tryptophanverarmung, sowie zu einer Anreicherung der entstehenden

Metaboliten im Tumormilieu führt [73, 10].

Arginin wird sowohl durch die Arginase (ARG) in Ornithin und Harnstoff umgesetzt, als auch durch die NO-Synthase (NOS) in Citrullin und NO. Ornithin und Citrullin sind wichtige Vorläufer des Polyaminstoffwechsels und somit essentiell für starkes Zellwachstum. NO führt unter anderem zu Vasodilatation, was den Tumor in seinem Wachstum begünstigen kann.

Es konnte gezeigt werden, dass ARG2 und NOS in Schilddrüsentumoren und im Prostatakarzinom koexprimiert vorliegen und eine Peroxynitrit-abhängige T-Zellsuppression auslösen. Eine Herunterregulation dieser Gene in Tumorzellen führt zu verringerter Proliferation und Apoptose [11, 22].

1.4.4 Der Lipidstoffwechsel

Da die Tumorentstehung häufig mit chronischer Entzündung in Zusammenhang steht, liegt es nahe, dass auch proinflammatorische Stoffwechselwege das Tumorstadium positiv beeinflussen. Von besonderer Bedeutung sind hier die beiden Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX1, COX2). COX1 ist in allen Geweben exprimiert und für die physiologische Produktion von Prostanoiden verantwortlich. Im Gegensatz dazu ist COX2 induzierbar und wird selektiv bei Entzündung exprimiert [122]. COX2 ist auch häufig in Tumoren, wie dem Kolonkarzinom (80%) und Brustkarzinom (40%) hoch exprimiert. Die erhöhte Expression von COX2 im Tumor steht in Zusammenhang mit Proliferation, Metastasierung, Invasion und Hemmung der Apoptose [5, 59, 68].

1.5 Pharmakologische Möglichkeiten zur Modulation des Glukosestoffwechsels

Veränderungen im Stoffwechsel des Tumors bieten vielfältige Möglichkeiten um therapeutische Ansätze zur Bekämpfung von Krebs zu entwickeln. Zahlreiche Wirkstoffe, die an unterschiedlichen Stoffwechselwegen eingreifen sind bereits bekannt.

Es gibt verschiedene Glykolyseinhibitoren, von denen das Glukoseanalog 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG) das bekannteste ist. Nach Aufnahme in die Zelle und Umsetzung zu 2-DG-6-Phosphat inhibiert es die Hexokinase 2, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Glykolyse und blockiert somit die weitere Umsetzung von Glukose [86]. Diese Eigenschaft nutzt die Positronen-Emissions-Tomographie mit ^{18}F -2-DG als etablierte Methode zur Detektion, Diagnose und Wachstumskontrolle von Tumoren [96]. Da Tumorzellen diese nicht verstoffwechselbare Substanz anreichern, lassen sich hoch glykolytische Tumore von normalem Gewebe abgrenzen. *In vitro* konnten

Hamilton et al. eine verringerte ATP-Produktion von Tumorzellen feststellen, wenn sie diese mit 2-DG inkubierten [44]. Weitere bekannte Glykolyseinhibitoren sind 3-Bromopyruvat (3-BP) und Iodoacetat (IAA). 3-BP ist, wie 2-DG, ein Hexokinase 2-Inhibitor und IAA blockiert die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase. Die Ergebnisse von Bhardwaj et al. zeigen, dass diese Glykolyseinhibitoren das Wachstum und die Migration von Pankreaskarzinomzelllinien *in vitro* inhibierten [8].

Weitere inhibitorische Effekte auf das Zellwachstum konnten Hamilton et al. bei Inkubation der Tumorzellen mit Oxamsäure feststellen [44]. Die Substanz blockiert die LDH was eine Inhibition der Laktatproduktion zur Folge hat. Eine Reduktion der aeroben Glykolyse durch Oxamat konnte *in vitro* auch von Fiume et al. in Leberzellkarzinomzelllinien bestätigt werden [37].

Die Ansäuerung im Tumormilieu durch die hohe glykolytische Aktivität des Tumors, zieht ein schlechtes Ansprechen gegenüber Chemotherapeutika nach sich. Zhou et al. konnten *in vitro* in humanen Brustkarzinomzelllinien, die eine Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Taxol aufwiesen, eine erhöhte LDHA-Expression feststellen [129]. Die Herunterregulation der LDHA mit siRNA in diesen Zelllinien führte zu einer starken Erhöhung der Sensitivität gegenüber Taxol. Somit liegt es nahe, dass Glykolyseinhibitoren, wie 2-DG besonders für Kombinationstherapien geeignet sind.

Maschek et al. konnten *in vivo* ähnliche Ergebnisse erzielen [75]. Bei der Untersuchung von Nacktmausmodellen des Osteosarkoms und Lungenkarzinoms konnten sie eine deutlich erhöhte Wirksamkeit von Adriamycin sowie Paclitaxel in Kombination mit 2-DG zeigen. Wurden den Mäusen diese Medikamente gemeinsam mit 2-DG verabreicht, führte dies zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums im Vergleich zu Kontrollen, die ausschließlich mit den Chemotherapeutika oder mit 2-DG behandelt wurden. *In vitro* wurde an Tumorzellen mehrfach gezeigt, dass 2-DG den Effekt von Radiotherapien um ein Vielfaches verstärkt [89, 106]. In diesem Zusammenhang konnten wir in Zusammenarbeit mit Karin Eberhart und Katrin Renner (Lehrstuhl für funktionelle Genomik, Universität Regensburg) konnten wir eine erhöhte Sensitivität akuter myeloischer Leukämiezellen gegenüber Glukokortikoiden zeigen, wenn diese zusätzlich mit 2-DG behandelt wurden [32].

Da auch Tyrosinkinasen, wie RAS/RAF, den Glukosemetabolismus regulieren, stellen Tyrosinkinaseinhibitoren eine Möglichkeit dar, pharmakologisch in die aerobe Glykolyse einzugreifen. Imatinib (Gleevec®) wird als gängiges Medikament zur Behandlung chronischer myeloischer Leukämien (CML) eingesetzt [26]. Das Medikament blockiert die mutierte Tyrosinkinase BCR-ABL, die in ca. 95% aller CML-Patienten zu finden ist. Dieses Fusionsprotein entsteht durch eine Trans-

lokation der Chromosomen 22 und 9 und führt zu unkontrollierter Proliferation und Stimulation der GLUT1-Expression [46]. Gottschalk et al. konnten mit Imatinib die Glukoseaufnahme in BCR-ABL mutierten Leukämiezellen blockieren [42]. Gleichzeitig zeigten diese erhöhte mitochondriale Aktivität sowie eine vermehrte Produktion von Zitratzyklusintermediaten.

HIF-1 α als zentraler Regulator der Glykolyse und der damit verbundene mTOR (*engl.* mammalian Target of Rapamycin) -Stoffwechselweg bieten weitere Angriffspunkte. Die GLUT1-Expression wird dabei über mTOR gesteuert, sowie über HIF-1 α , welches wahrscheinlich über mTOR reguliert wird [47]. Dies erklärt eine Blockade der Glukoseaufnahme durch den mTOR-Inhibitor Rapamycin [123]. mTOR spielt besonders im Nierenzellkarzinom eine große Rolle. Hier wird Temsirolimus bereits als gängiges Medikament eingesetzt [54], was eine Blockade von VEGF zur Folge hat [27]. Auch von anderen bekannten Medikamenten wurde gezeigt, dass sie mTOR und dadurch HIF-1 α regulieren, was indirekt auch zu einer Regulation der Glykolyse führen könnte [91].

Ein anderer Ansatz, den Glukosemetabolismus in Tumorzellen zu beeinflussen, besteht in der Reaktivierung der gestörten mitochondrialen Aktivität. Dichloracetat blockiert die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase-Kinase (PDK) [80]. Die PDK reguliert die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase, die für die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA verantwortlich ist. Somit reaktiviert Dichloracetat (DCA) den mitochondrialen Stoffwechsel in hochglykolytischen Tumorzellen. Das Medikament wird im Patienten bisher zur Behandlung von Azidosen bei Kindern eingesetzt. *In vitro* konnte eine Proliferationsinhibition durch DCA bei Kolonkarzinomzellen gezeigt werden [74]. Aber auch in ersten *in vivo* Modellen zeigt das Medikament Wirkung [113]. Sun et al. injizierten Mammakarzinomzellen intravenös in Ratten. Eine gleichzeitige Verabreichung von DCA verminderte dabei die Bildung von Lungenmetastasen um 58%. Eine inhibitorische Wirkung von DCA auf das Tumorwachstum *in vivo* konnten auch Bonnet et al. zeigen [9]. Sie injizierten Tumorzellen subkutan in immundefiziente Ratten. Diesen wurde über mehrere Wochen DCA mit dem Trinkwasser oral verabreicht. Im Vergleich zu Kontrolltieren, die nur reines Wasser zu trinken bekamen, war ein deutlich verringertes Tumorwachstum in diesen Ratten erkennbar.

1.6 Der Effekt von Tumormetaboliten auf das Immunsystem

Tumore sind von verschiedenen Immunzellen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen, myeloiden Suppressorzellen und T-Zellen, infiltriert und der veränderte Tumormetabolismus hat Einfluss auf das Immunsystem. Die verschiedenen Tumormetaboliten wirken dabei entweder direkt inhibitorisch auf die T-Zellen oder indirekt über die Modulation von antigenpräsentierenden Zellen.

Die aerobe Glykolyse führt im Tumor zu einer erhöhten Produktion an Laktat. Dies wird über

einen Proton-gekoppelten Kotransport durch die Monocarboxylattransporter MCT1 und MCT4 aus der Zelle geschleust [43], was eine Ansäuerung im Tumormilieu zur Folge hat. Hierbei können Laktatkonzentrationen von 8 - 40 $\mu\text{mol/g}$ entstehen, die mit der Tumormalignität korrelieren [118, 119, 120].

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Laktat die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen inhibiert und die Zytokinproduktion und Antigenexpression dendritischer Zellen verändert wird [39, 40]. Ähnliche Ergebnisse zeigen Arbeiten von Douvdevani et al. [29] und Puig-Kröger et al. [90]. Douvdevani et al. zeigten, dass die TNF- und IL-1 β -Sekretion in Monozyten und Makrophagen reduziert war, wenn diese mit Peritonealdialyse-Flüssigkeit mit niedrigem pH und hoher Laktatkonzentration inkubiert wurden [29]. Die Ergebnisse von Puig-Kröger et al. zeigten, dass Glukosemetaboliten in der Peritonealdialyse-Flüssigkeit inhibitorische Effekte auf die Differenzierung von Monozyten haben [90]. Unsere Arbeitsgruppe konnte eine inhibitorische Wirkung von Laktat auf humane Monozyten beobachten [28]. Hierbei wurde die TNF-Sekretion gehemmt, wobei die Inhibition der Glykolyse eine wichtige Rolle spielt.

Weiterhin inhibiert Laktat die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, die entscheidende Effektorzellen im Tumor sind [36].

Außer dem Glukosestoffwechsel und Laktat spielt auch der Aminosäurestoffwechsel des Tumors, insbesondere die dabei beteiligten Enzyme IDO und ARG, eine bedeutende Rolle bei der Modulation von Immunzellen. IDO und ARG können sowohl vom Tumor selbst als auch von infiltrierenden myeloiden Zellen exprimiert werden, was unter normalen physiologischen Bedingungen wahrscheinlich überschießende Immunreaktionen verhindert [97, 55]. Durch Tryptophan- und Argininverarmung im Tumormilieu inhibieren diese Enzyme T-Zellen, für die beide Aminosäuren essentiell sind [81, 116]. Dendritische Zellen, die IDO exprimieren, werden dadurch von ihrer ursprünglichen stimulatorischen Funktion zu Inhibitoren der T-Zellantwort [81, 88], da entstehende Metaboliten wie Kynurenin, Ornithin und NO hemmend auf die T-Zellantwort wirken [97, 87].

Darüber hinaus spielt der Glutaminstoffwechsel eine Rolle bei der Immunmodulation. Von der Zelle aufgenommenes Glutamin wird durch die Glutaminase zu Glutamat umgewandelt. Dies kann entweder über die Zwischenform α -Ketoglutarat im Zitratzyklus verstoffwechselt oder über Glutamatttransporter aus der Zelle geschleust werden und dort die Aktivität von T-Zellen inhibieren. Pacheco et al. fanden Glutamatttransporter in antigenpräsentierenden Zellen sowie Glutamatrezeptoren auf T-Zellen, was die immunmodulatorische Funktion von Glutamat ermöglicht [83]. Im Kolonkarzinom konnte zudem gezeigt werden, dass erhöhte Glutamatspiegel im Serum von Tumorpatienten mit einer verminderten T-Zellinfiltration korrelierten [31].

Zusammenfassend wurde hier dargestellt, dass verschiedene Dysregulationen im Metabolismus von Tumoren bekannt sind, deren Ursachen hauptsächlich auf genetischen Veränderungen beruhen. Diese veränderten Stoffwechselwege sowie dabei entstandene Metaboliten beeinflussen die Immunantwort und begünstigen dadurch das Tumorwachstum. Eine Blockierung dieser Stoffwechselwege auf pharmakologischer Ebene zeigt bereits, dass der Tumor sowohl in seinem Wachstum selbst inhibierbar ist, damit aber auch eine Reaktivierung von Immunzellen möglich ist. Der Tumormetabolismus wird hier zu einem attraktiven Ziel in der Entwicklung von Therapien. Erkenntnisse über diese dysregulierten Stoffwechselwege und die Auswirkungen dabei entstehender Metaboliten auf das Immunsystem, liefern hier wichtige Erkenntnisse zur Entwicklung von Immuntherapien.

2 Zielsetzung

Viele Tumore sezernieren Metaboliten, welche die Immunantwort negativ modulieren können. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits in früheren Experimenten zeigen, dass Laktat, das Endprodukt der Glykolyse, inhibitorische Effekte auf Immunzellen hat. Daneben ist aus der Literatur bekannt, dass Stoffwechselprodukte sowohl des Arginin- als auch des Tryptophanstoffwechsels einen negativen Einfluss auf Tumor-infiltrierende Immunzellen haben. Die Sekretion verschiedener Metabolite im Tumormilieu supprimiert somit Immunzellen, wodurch sich der Tumor dem Angriff durch das Immunsystem entziehen kann. Im Rahmen dieser Arbeit sollte dieser „Immunescape“ Mechanismus näher untersucht werden. Ein wichtiger Aspekt war hierbei, dass nicht nur ein Stoffwechselweg selektiv, sondern ein Gesamtprofil der wichtigsten bekannten immunmodulatorisch wirkenden Wege im Vergleich untersucht werden sollte. Als Modellsystem für Tumore sollten hierzu Tumorzelllinien unterschiedlichen Ursprungs mit primären Zellen aus entsprechenden Geweben sowie Immunzellen auf genetischer Ebene verglichen werden. Die Metaboliten sollten anschließend in Zellkulturüberständen von Tumorzelllinien nachgewiesen werden. Weiterhin sollten mit einem shRNA-Konstrukt humane und murine Tumorzelllinien generiert werden, bei denen die Laktatdehydrogenase A stabil herunterreguliert ist, um eine verringerte Laktatsekretion zu erreichen. Diese Zelllinien sollten generiert werden, um *in vitro* und *in vivo* den Effekt einer verringerten Laktatsekretion auf das humane und murine Immunsystem zu untersuchen. Zusammenfassend sollten die durchgeführten Experimente einen tieferen Einblick in den Tumormetabolismus liefern, um in weiterführenden Analysen die Effekte von Tumormetaboliten auf das Immunsystem genauer untersuchen zu können.

3 Material

3.1 Geräte

Gerät	Firma, Ort
Autoklav	Technomara, Fernwald, Deutschland
ADVIA 1650	Bayer, Tarrytown, NY
BD FACSAria	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Bioanalyzer	Agilent, Waldbronn, Deutschland
Elektrophorese-Apparaturen	Biometra, Göttingen, Deutschland
ELISA-Plattenlesegerät	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Heat sealer Fermant 400	Josten & Kettenbaum, Bensberg, Deutschland
Inkubatoren	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kamera	Polaroid, Cambridge, USA
Keramikmörser	Haldenwanger, Berlin, Deutschland
Laminar air flow cabinet Lamin Air HA 2472	Heraeus, Osterode, Deutschland
Mikroskope	Zeiss, Jena, Deutschland
Multipipettor Multipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Netzgeräte	Biometra, Göttingen, Deutschland
Neubauerzählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
PCR-Thermocycler PTC-200	MJ-Research/Biometra, Oldendorf, Deutschland
PCR-Thermocycler Veriti 384 well	Applied Biosystems, Foster City, USA
pH-Meter	Knick, Berlin, Deutschland
Picofuge	Heraeus, Osterode, Deutschland
Realplex Mastercycler epGradient S	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
SDR SensorDish® Reader	Presens, Regensburg, Deutschland
Sorvall RC 6 plus	Thermo Fisher Scientific, Hudson, USA

Gerät	Firma, Ort
Speed Vac	Christ, Osterode, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex	Scientific Instudies Inc., New York, USA
Wallac Harvester	PerkinElmer, Gaithersburg, MD
Wallac Betaplate Counter	PerkinElmer, Gaithersburg, MD
Wasserreinigungsanlage	Millipore, Eschborn, Deutschland
Wasserbad	Julabo, Seelstadt, Deutschland
Western Blot-Kammer	Biometra, Göttingen, Deutschland

Tabelle 3.1: **Geräte**

3.2 Verbrauchsmaterial

Material	Firma, Ort
Kryo-Röhrchen	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heat sealing film	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kanülen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Kunststoffschaber	Costar, Cambridge, USA
Multiwell Zellkulturplatten und Röhrchen	Falcon, Heidelberg, Deutschland
PCR Platten Twin.tec 96-Well	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Skapelle	FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Spritzen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Zellkultur-Flaschen und -Pipetten	Costar, Cambridge, USA

Tabelle 3.2: **Verbrauchsmaterial**

3.3 Chemikalien, Kits und Reagenzien

Kit	Firma, Ort
α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Blasticidin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Kit	Firma, Ort
2-Deoxy-D-Glukose	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DNA Leiter 1 kb plus	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNA Molekulargewichtstandard	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
dNTPs	NEB, Frankfurt, Deutschland
ECL Detektions-Kit	GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien
FastStart Taq DNA-Polymerase	Roche, Mannheim, Deutschland
Fötale Kälberserum	PAA, Cölbe, Deutschland
G418	PAA, Cölbe, Deutschland
Kaleidoscope pre-stained standard protein marker	Biorad, München, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Lipofectamine™2000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid Quick Pure	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
OptiMEM	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Oxamsäure	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein, Deutschland
Plasmid Midi-Kit (endo-free)	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAGEN Plasmid Mini-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Gelextraktions-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Aufreinigungs-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QuantiTect SYBR green	Qiagen, Hilden, Deutschland
Quick Ligation-Kit	NEB, Frankfurt, Deutschland
RIPA-Puffer	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
RPMI 1640	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Suresilencing™ shRNA Plasmid-Kit	Biomol, Hamburg, Deutschland
RNeasy Mini-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
TOPO TA Cloning®-Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsininhibitor Typ I-S	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Tabelle 3.3: **Chemikalien, Kits und Reagentien**

Weitere Chemikalien, die in obiger Tabelle nicht aufgeführt sind, wurden von den Herstellern Sigma (Deisenhofen, Deutschland) oder Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Für alle Lösungen, Puffer und Reaktionsansätze wurde grundsätzlich nur Millipore-gereinigtes, entionisiertes Wasser

oder DEPC-behandeltes $\text{H}_2\text{O}_{\text{USB}}$ der Firma Amersham (Braunschweig, Deutschland) verwendet.

3.4 Plasmide

pCR®2.1-TOPO

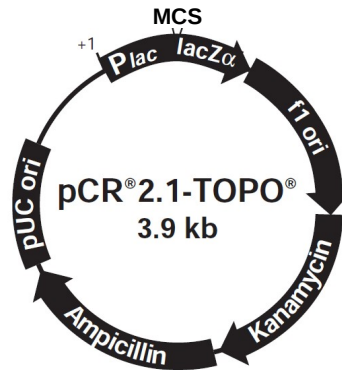


Abbildung 3.1: **pCR®2.1-TOPO**. Das Plasmid wurde zur Klonierung von PCR-Produkten in Bakterien verwendet. Es besitzt eine „multiple cloning site“ (MCS) zur Einbringung von DNA-Fragmenten in einem *lacZα*-Gen („blue/white-screening“) und zwei Resistenzgene gegen Ampicillin und Kanamycin zur Antibiotika-Selektion. Firma: Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland.

pGeneClip hMGFP

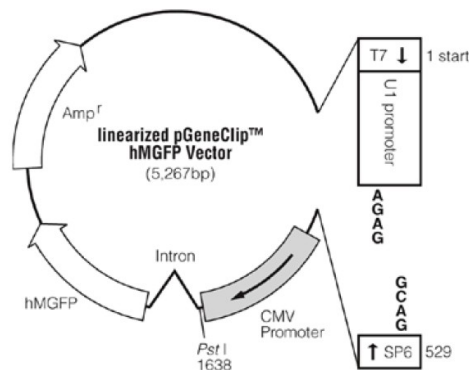


Abbildung 3.2: **pGeneClip hMGFP**. Dieses Plasmid wurde zur Herunterregulation der LDHA in den Melanomzelllinien Melm und B16.SIY E12 verwendet und beinhaltete jeweils eines der 4 verschiedenen shLDHA-Sequenzen bzw. eine sog. „scrambled“-Sequenz für die Kontrollen unter der Regulation eines CMV-Promotors. Diese „scrambled“-Sequenz besteht aus einer *in silico*-konstruierten Basenzusammensetzung, die an keiner bekannten mRNA-Sequenz bindet. Weiterhin sind auf dem Plasmid ein Ampicillinresistenzgen zur Antibiotikaselektion und ein *GFP*-Gen zur Selektion per Zellsorter und Kontrolle der Transfektionsrate.

pGene/V5-His

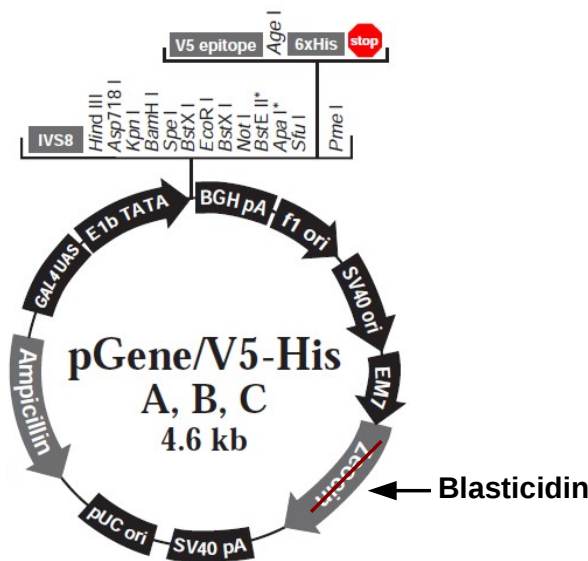


Abbildung 3.3: **pGene/V5-His**. Da die B16.SIY E12 Zelllinien bereits mit einem Plasmid transfiziert wurden, das ein Ampicillinresistenzgen enthält, wurden diese mit einem pGene/V5-His Plasmid kotransfiziert. Bei diesem Plasmid wurde die Zeozinresistenz gegen eine Blastocidinresistenz ersetzt. Somit konnten die Zellen nach der Transfektion und über mehrere Passagen hinweg mit Blastocidin unter Selektionsdruck gehalten werden.

3.5 Antikörper für Western-Blot

Reaktivität (<i>Spezies</i>)	generiert in	Isotyp	Firma, Ort
anti- β -Aktin (<i>Mensch</i>)	<i>Kaninchen</i>	IgG	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
anti-IgG, HRP conj. (<i>Ziege</i>)	<i>Kaninchen</i>	IgG	Dako, Hamburg, Deutschland
anti-LDHA (<i>Mensch, Maus, Ratte</i>)	<i>Kaninchen</i>	IgG	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-LDHB (<i>Mensch</i>)	<i>Maus</i>	IgG	Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
anti-IgG, HRP conj. (<i>Maus</i>)	<i>Ziege</i>	IgG	Dako, Hamburg, Deutschland
anti-IgG, HRP conj. (<i>Kaninchen</i>)	<i>Ziege</i>	IgG	Dako, Hamburg, Deutschland

Tabelle 3.4: **Antikörper**

3.6 Oligonukleotide

3.6.1 RT-qPCR-Primer für humane Sequenzen

Beschreibung	Gen		Sequenz: 5' → 3'
18s rRNA	<i>RN18S1</i>	forward	ACCGATTGGATGGTTT TAGTGAG
		reverse	CCTACGGAAACCTTGTTACGAC
Arginase 1	<i>ARG1</i>	forward	AGTGGAACCTTGCATGGACAACCT
		reverse	GGCAGATATACAGGGAGTCACCCA
Arginase 2	<i>ARG2</i>	forward	GATGCCCATGCTGACATCAACAC
		reverse	TGTGGTACCTTATCCTGTAGTTCTCTG
CD1a	<i>CD1a</i>	forward	TATTCCGTATACGCACCATTCGGTC
		reverse	CAGCCTCCTGTCACCTGTATCTC
CD1e	<i>CD1e</i>	forward	CCTGGTCATATTGGTTGTAGTTGACTC
		reverse	TGTTGGCTCCCATGAGAAAGACAG
CD3e	<i>CD3e</i>	forward	TGAGGGCAAGAGTGTGTGAG
		reverse	TAGTCTGGGTTGGGAACAGG
CD4	<i>CD4</i>	forward	ATGTGGCAGTGTCTGCTGAG
		reverse	GATGCCTAGCCCAATGAAAA
CD8	<i>CD8</i>	forward	CCCTGAGCAACTCCATCATGT
		reverse	GTGGGCTTCGCTGGCA
CD83	<i>CD83</i>	forward	CCCTGCACAGCGTAAAGAAGAGAC
		reverse	TCATACCAGTTCTGTCTGTGAGGAG
Cyclooxygenase 1	<i>COX1</i>	forward	CTACGAGCAGTTCTTGTTC AACACC
		reverse	ATGACATCCACAGCCACATGCAG
Cyclooxygenase 2	<i>COX2</i>	forward	CCAGAGCAGGCAGATGAAATACCAG
		reverse	TCGATGTCACCATAGAGTGCTTCC
FOXP3	<i>FOXP3</i>	forward	GAAACAGCACATTCCCAGAGTTC
		reverse	ATGGCCCAGCGGATGAG
Glukosetransporter 1	<i>GLUT1</i>	forward	AACTCTTCAGCCAGGTCCAC
		reverse	CACAGTGAAGATGATGAAGACGTAGGG
Glukosetransporter 3	<i>GLUT3</i>	forward	CTTCGTCAACCGCTTTGGCAG
		reverse	TAACCAAGCGACCCAGGATCAG

Beschreibung	Gen		Sequenz: 5' → 3'
Glukosetransporter 14	<i>GLUT14</i>	<i>forward</i>	AGCTGGGCATAGTTATTGGAATTCTG
		<i>reverse</i>	CTTTCAGGGCAACATGGAAGGG
Indolamin-2,3-Dioxygenase	<i>IDO1</i>	<i>forward</i>	GGTCATGGAGATGTCCGTAAGGT
		<i>reverse</i>	CCAGTTTCTTGGAGAGTTGGCAG
induzierbare NO-Synthase	<i>iNOS</i>	<i>forward</i>	AAGCCCAGGTTCTACTCCATCAG
		<i>reverse</i>	ATCTCGGGTGTGGTAGGTGAC
Laktatdehydrogenase A	<i>LDHA</i>	<i>forward</i>	GGTTGGTGCTGTTGGCATGG
		<i>reverse</i>	TGCCCCAGCCGTGATAATGA
Laktatdehydrogenase B	<i>LDHB</i>	<i>forward</i>	GATGGTGGTTGAAAGTGCCATGAAGTC
		<i>reverse</i>	AGCCACACTTAATCCAATAGCCCA
Malatdehydrogenase	<i>MDH</i>	<i>forward</i>	GCTCAAATTGCTCTTAAACTTGGTGTG
		<i>reverse</i>	AGCTTCATAAACACCAACTTCCTTTCC
Monocarboxylattransporter 1	<i>MCT1</i>	<i>forward</i>	GCAGCTTCTTTCTGTAACACCGT
		<i>reverse</i>	GTCGCCTCTTGTAGAAATACTTGCC
Monocarboxylattransporter 4	<i>MCT4</i>	<i>forward</i>	GGCCCTGCCAATGATTGCT
		<i>reverse</i>	GCATCAGAGGGACGAAGAAGAGGA
Pyruvatdehydrogenase	<i>PDH</i>	<i>forward</i>	TTGTTGCCTGAAGAATACCAAGGAGGA
		<i>reverse</i>	TTCAGCACAGGTCGGAACCTC

Tabelle 3.5: RT-qPCR-Primer für humane Sequenzen

3.6.2 RT-qPCR-Primer für murine Sequenzen

Beschreibung	Gen		Sequenz: 5' → 3'
Laktatdehydrogenase A	<i>Ldha</i>	<i>forward</i>	TATCTTAATGAAGGACTTGGCGGATGAG
		<i>reverse</i>	GGAGTTCGCAGTTACACAGTAGTC
Laktatdehydrogenase B	<i>Ldhb</i>	<i>forward</i>	TTGTGGCCGATAAAGATTACTCTGTGAC
		<i>reverse</i>	AGGAATGATGAACTTGAACACGTTGAC

Tabelle 3.6: RT-qPCR-Primer für murine Sequenzen

3.7 Bakterienstämme

Bakterienstamm	genetischer Hintergrund
TOP 10	F – mcrA Δ (mrr – hsdRMS – mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara – leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG

Tabelle 3.7: **Bakterienstämme**

Der Bakterienstamm TOP 10 wurde zur Vermehrung der Plasmide pGeneClip hMGFP und pGene/V5-His vor der Transfektion verwendet.

3.8 Tumorzelllinien

Zelllinie	Organismus	Gewebe	Tumortyp
B16.SIY E12	<i>Mus Musculus</i>	Haut	Melanom
Hela	<i>Homo sapiens</i>	Epithel	Zervixkarzinom
Hep3B	<i>Homo sapiens</i>	Leber	hepatozelluläres Karzinom
J82	<i>Homo sapiens</i>	Harnblase	Urothelkarzinom
LNCap	<i>Homo sapiens</i>	Epithel	Prostata Adenokarzinom
Mellm	<i>Homo sapiens</i>	Haut	Melanom
Na8	<i>Homo sapiens</i>	Haut	Melanom
PC3	<i>Homo sapiens</i>	Prostata	Prostatakarzinom
RCL1503	<i>Homo sapiens</i>	Niere	Nierenzellkarzinom
RT4	<i>Homo sapiens</i>	Niere	Blasenkarzinom
SW620	<i>Homo sapiens</i>	Kolon	kolorektales Adenokarzinom

Tabelle 3.8: **Zelllinien**

3.9 Patientenmaterial

Gewebe	Material	Herkunft
Urothel	Kryoschnitte	Prof. Dr. med. Arndt Hartmann, Pathologisches Institut, Universitätsklinikum Erlangen

Gewebe	Material	Herkunft
hepatozelluläres Karzinom (HCC)	RNA aus Biopsien	Prof. Dr. med. Claus Hellerbrand, Abteilung für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Regensburg
Nierenzellkarzinom (RCC)	Biopsien	Prof. Dr. med. Andreas Mackensen, Medizinische Klinik 5, Hämatologie/Onkologie, Universitätsklinikum Erlangen

Tabelle 3.9: **Patientenmaterial**

3.10 Mäuse

Mausstamm	Firma, Ort
C57/BL6	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
C57/BL6 <i>Rag1</i> ^{-/-}	I. Weissman, Stanford University

Tabelle 3.10: **Mausstämme**

3.11 Software

Software	Hyperlink
Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org
GNU R	http://www.r-project.org
Graphpad Prism 5	http://www.graphpad.com/prism
L ^A T _E X	http://www.latex-project.org
Debian Linux	http://www.debian.org
Microsoft Office 2003	http://www.microsoft.com
Openoffice.org 3.1	http://www.openoffice.org
PerlPrimer 1.1.14	http://perlprimer.sourceforge.net
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez
UCSC Genome Browser	http://genome.ucsc.edu

Tabelle 3.11: **Software**

4 Methoden

4.1 Mikrobiologische Methoden

4.1.1 Anzucht und Kultur von Bakterien

Für die Anzucht und Kultur von Bakterien wurden Medien und Agar-Platten nach folgenden Protokollen hergestellt:

- LB-Medium

Trypton	10 g
---------	------

Hefeextrakt	5 g
-------------	-----

NaCl	5 g
------	-----

Mit H₂O ad 1000 ml, mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren. Lösung auf ca. 50 °C abkühlen lassen, bevor Antibiotika zugegeben werden.

- LB-Agar

Trypton	10 g
---------	------

Hefeextrakt	5 g
-------------	-----

NaCl	5 g
------	-----

Agar	15 g
------	------

Mit H₂O ad 1000 ml und autoklavieren. Lösung im Wasserbad auf ca. 50 °C abkühlen lassen bevor Antibiotika zugegeben werden. Anschließend in sterile Petrischalen gießen und bei 4 °C lagern.

E. coli-Stämme wurden auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Einzelne Kolonien wurden gepickt und in LB-Medium überimpft. Die Anzucht erfolgte über Nacht bei 37 °C und 200×rpm im Schüttler. Zur Selektion wurde Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml dem Medium und den Agar-Platten zugegeben.

4.1.2 Transformation von *E. coli*

Um Plasmide zur Vermehrung in *E. coli* einzuschleusen, wurde eine Transformation durch Hitzeschock durchgeführt. *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut, 5 µl Plasmid-DNA (1-25 ng) zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Wasserbad bei einer Temperatur von 42 °C für 60 s einem Hitzeschock ausgesetzt und dann sofort für 60 s auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum) wurde zur Ausbildung der Resistenz für 1 h bei 37 °C und 200 x rpm geschüttelt. Zum Auffinden Insert-enthaltender Klone per „blue/white-screening“ wurde auf die vorgewärmten Agarplatten 40 µl X-Gal ausgestrichen und die Platten nochmals im Brutschrank angewärmt. Nach 30 min wurde 100 µl des Transfektionsansatzes ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.1.3 Glycerin-Stocks

Zur längerfristigen Lagerung von Bakterienstämmen und Klonen wurden Glycerin-Stocks angelegt. Dazu wurde 250 µl Bakteriensuspension zu 750 µl LB_{Glycerin} (40 % Medium + 60 % Glycerin) pipettiert, über Nacht bei -20 °C und anschließend bei -80 °C gelagert.

4.1.4 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Um Plasmide aus *E. coli*-Übernightkulturen zu isolieren, wurde eine Plasmidisolierung mit dem NucleoSpin® Plasmid Quick Pure-Kit von Macherey-Nagel nach beiliegendem Protokoll durchgeführt. Zur Aufreinigung größerer Mengen an Plasmid-DNA für Transfektionsexperimente wurde der endotoxin-free QIAGEN Plasmid Midi-Kit verwendet.

4.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen (RNA, DNA) wurde ein Nanodrop ND-1000 (Peglab) verwendet. Für die Messung wurde 1,5 µl unverdünnte Nukleinsäure-Lösung eingesetzt.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Methoden der RNA-Isolierung

Für Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene per Real-time quantitativer PCR wurde RNA aus verschiedenen Zellen und Geweben isoliert. Dazu wurde je nach vorhandenem Ausgangsmaterial ein

QIAGEN RNeasy Mini- bzw. Micro-Kit verwendet. Zur Scherung genomischer DNA wurde das Lysat fünf bis sechs Mal in einer 1 ml Spritze + blauer Kanüle aufgezogen. Die Integrität der RNA wurde mit dem Agilent Bioanalyzer bestimmt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die RNA am Nanodrop (Peglab) vermessen.

4.2.1.1 Isolation von RNA aus Tumorzellen

Tumorzelllinien wurden über Nacht in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/2 ml in 6-Well-Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen einmal mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend in 350 μ l RLT-Puffer (QIAGEN RNeasy-Kit) + β -Mercaptoethanol lysiert.

4.2.1.2 Isolation von RNA aus Kryoschnitten

Ein Metallblock wurde einige Minuten auf Eis vorgekühlt. Die Kryoschnitte auf Objektträgern wurden in gefrorenem Zustand auf den Block gelegt und mit 100 μ l RLT-Puffer + β -Mercaptoethanol überschichtet. Mit einem sterilen Kunststoffschaber wurde das Lysat an den Rand des Objektträgers geschabt und mit einer Pipette in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß, in dem 250 μ l RLT-Puffer + β -Mercaptoethanol vorgelegt wurden, überführt.

4.2.1.3 Isolation von RNA aus Tumorbiopsien

Ein Keramikmörser wurde 30 min mit 1 M NaOH (zur Zerstörung von RNAsen) gewaschen, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ gespült und auf Trockeneis vorgekühlt. 50 μ l RLT-Puffer + β -Mercaptoethanol wurden im Mörser mit etwas flüssigen Stickstoff gefroren und pulverisiert. Anschließend wurde die Tumorbiopsie dazugegeben, pulverisiert und das ganze Gemisch in noch gefrorenem, pulverförmigen Zustand mit einem Spatel (RNase frei durch 30 min in 1 M NaOH) in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, in dem 300 μ l RLT-Puffer + β -Mercaptoethanol vorgelegt wurden.

4.2.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Um mRNA-Expressionsanalysen per Real-time quantitativer PCR (RT-qPCR) durchführen zu können wurde aus der RNA in einer reversen Transkription cDNA synthetisiert. Dazu wurde standardmäßig pro Probe 500 ng RNA in einem Gesamtreaktionsansatz von 20 μ l umgeschrieben. War Ausgangsmaterial wie z.B. Kryoschnitte oder Gewebebiopsien vorhanden, aus dem sich keine entsprechende Menge RNA isolieren ließ, wurde die Menge an RNA für eine Reaktion auf bis zu 100 ng herabgesetzt. Um sicher zu stellen, dass bei so geringen RNA-Mengen die mRNA-Quantifizierung

noch verlässliche Ergebnisse produziert wurden verschiedene RNA-Mengen der Tumorzelllinie Me-llm im Bereich von 100 ng-1000 ng für eine RT-PCR eingesetzt und die Expressionslevels in einer anschließenden RT-qPCR verglichen (Abb. 4.1).

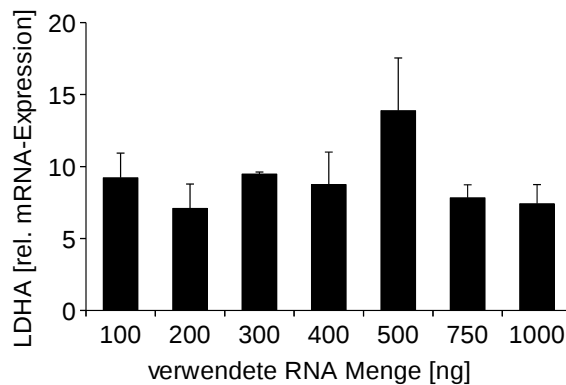


Abbildung 4.1: **RNA-Titration für RT-PCR bzw. RT-qPCR.**

Da in der RT-qPCR zur Normalisierung 18S rRNA verwendet wurde, wurden als Primer für die RT-PCR random-Decamere eingesetzt, die auch die 18S rRNA ohne Poly-A-Schwanz umschreiben.

<u>Reaktionsansatz (auf Eis pipettiert):</u>	RNA (500 ng)	x µl
	RNAse freies H ₂ O	13-x µl
	random-Decamere (10 µM)	1 µl
	dNTPs (10 µM)	1 µl

- 5 min auf 65 °C, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen
- +4 µl 5x M-MLV Puffer
- mischen und 2 min auf 42 °C
- +1 µl M-MLV reverse Transkriptase (Promega)
- 50 min auf 42 °C
- 15 min auf 70 °C

4.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR erlaubt die *in vitro*-Amplifikation großer Mengen spezifischer DNA-Abschnitte im Genom in kurzer Zeit. Benötigt werden hierfür prinzipiell ein DNA-Template, eine thermostabile DNA-Polymerase und sequenzspezifische Primer, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren.

Im folgenden Abschnitt werden Bedingungen und Reagenzien für eine Standard-PCR beschrieben. Abweichungen von den Standardbedingungen sind im folgenden Text vermerkt.

4.2.3.1 Primerdesign

Sequenzen der genomischen DNA für das Primerdesign wurden aus der Onlinedatenbank „Ensembl Genome Browser“¹ bezogen. Die Primer wurden mit der Software Perlprimer² konstruiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Oligosequenzen einen CG-Gehalt von ca. 40-60 % enthielten. Primer für Standard-PCRs wurden, bezüglich Annealing-Temperatur und Länge, entsprechend den spezifischen Versuchsbedingungen gewählt. Für das Design von RT-qPCR-Primern galten folgende Kriterien:

Schmelztemperatur (T_m)	65-68 °C
Länge	18-28 bp
Amplikon Länge	70-200 bp

Die Spezifität der Primer wurde mittels BLAT³ und *in silico*-PCR⁴ kontrolliert, um die Amplifikation unspezifischer Nebenprodukte zu verhindern. RT-qPCR-Primer zur Quantifizierung von mRNA wurden auf zwei verschiedene Exons, die ein Intron umspannen, gelegt um die Amplifikation genomischer DNA zu verhindern. Bestellt wurden die Primer bei Metabion⁵ (Martinsried, Deutschland).

4.2.3.2 Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen

Standard PCRs für Klonierungen wurden in 0,5 ml PCR Cups in einem Gesamtvolumen von 50 µl auf einem MJ Research PTC 200 Thermocycler (BioZym) durchgeführt. Die Annealingtemperaturen der Primer variierten zwischen 58 °C und 65 °C. Primersequenzen sind den Tabellen aus Abschnitt 3.6 zu entnehmen. Für Standard-PCRs wurde die FastStart Taq DNA-Polymerase (Mannheim, Deutschland) unter folgenden Reaktionsbedingungen benutzt:

¹<http://www.ensembl.org>

²<http://perlprimer.sourceforge.net>

³<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>

⁴<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?db=hg18>

⁵<http://www.metabion.com>

<u>Reaktionsansatz:</u>	DNA-Template	x µl
	dNTPs (10 mM)	1 µl
	Primer sense	1 µl
	Primer asense	1 µl
	10x PCR Buffer	10 µl
	FastStart Taq DNA Polymerase	1 µl
	H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl

Standard Thermocycler Programm:

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95°C	30 s	
Denaturierung	95°C	10 s	} 35 Zyklen
Annealing	58 – 65°C	20 s	
Elongation	72°C	$\frac{30\text{ s}}{1\text{ kb}}$	
finale Elongation	72°C	5 min	
	4°C	hold	

4.2.3.3 Real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

Die modernste und schnellste Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren ist derzeit die RT-qPCR. Grundlegend basiert diese Technologie auf der Erzeugung fluoreszierender PCR-Produkte. Dem Reaktionsansatz wird der Farbstoff SYBR® Green I zugegeben, der dabei in doppelsträngige DNA interkaliert und in gebundenem Zustand fluoresziert. Mit zunehmender Anzahl an PCR-Produkten steigt proportional dazu auch die Fluoreszenz. Diese kann in einer PCR-Maschine, die mit UV-Lampe und CCD-Kamera ausgestattet ist, am Ende jedes Zyklus gemessen und verfolgt werden. Somit kann die zu Beginn vorhandene Menge an Nukleinsäuren über die Kinetik der PCR-Reaktion bestimmt werden. Es werden also keine absoluten Mengen an PCR-Produkt gemessen sondern relative Unterschiede zwischen verschiedenen Proben bezüglich eines internen Standards.

Die RT-qPCRs wurden in twintec 96-Well-Platten an einem Realplex Mastercycler epGradient S (Eppendorf) durchgeführt. Ansätze wurden in einem Reaktionsgesamtvolumen von 10 µl mit dem QuantiFast SYBR Green PCR-Kit (Qiagen) durchgeführt.

<u>Reaktionsansatz:</u>	QuantiFast SYBR Green PCR-Mix	5 µl
	cDNA (mind. 1:5 verd.)	1 µl
	Primer sense (10 µM)	0,5 µl
	Primer asense (10 µM)	0,5 µl
	RNAse freies H ₂ O	3 µl

Die cDNA wurde dabei mindestens 1:5 verdünnt. Um valide Ergebnisse zu gewährleisten wurden bei allen Versuchen technische Replikate in Form von Triplikaten pipettiert. Zur Quantifizierung und Effizienzkontrolle der Reaktion wurde für jedes Primerpaar eine Eichkurve mit einer Positivkontrolle über mehrere Logstufen mit einer Kontrolle erstellt (unv. - 1:10 - 1:50 - 1:100 - 1:500 - 1:1000). Um valide Messungen zu gewährleisten, wurden nur Messwerte verwendet, die sich innerhalb der Eichkurve befanden.

Standard 2step RT-qPCR Programm:

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	8 s	} 45 Zyklen
Annealing/Elongation	60°C	20 s	
Schmelzkurve	95°C	15 s	
	65°C	15 s	
	65 – 95°C	10 min	

Die Quantifizierung von Nucleinsäuren beruht bei dieser Technologie auf der Kinetik der PCR. Wie in Abbildung 4.2 zu erkennen ist, kann die PCR-Reaktion durch einen sigmoidalen Verlauf beschrieben werden.

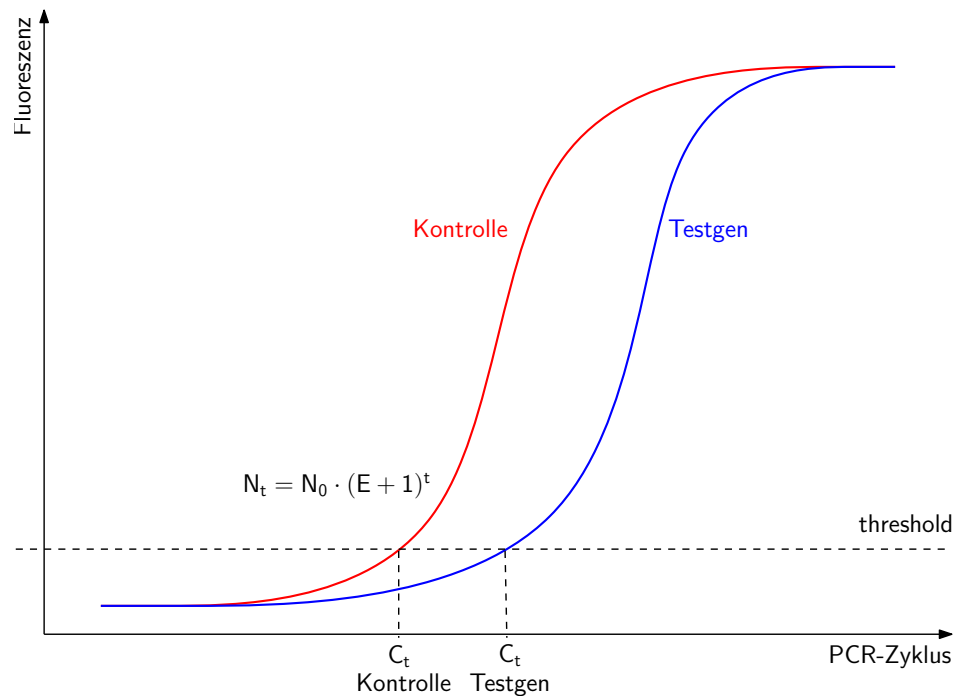


Abbildung 4.2: **Prinzip der RT-qPCR.** Die PCR-Reaktion wird durch einen sigmoidalen Verlauf beschrieben, der zu Beginn der Reaktion als weitgehend exponentiell betrachtet werden kann ($N_t = N_0 \cdot (E + 1)^t$). In diesem Bereich wird die Produktmenge durch die Kinetik der PCR analysiert. Der Threshold-Cycle wird als der Zyklus beschrieben, bei dem sich die Fluoreszenz gerade deutlich von der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Zur Normalisierung aller Proben wird zusätzlich ein möglichst konstant exprimiertes Kontrollgen benötigt.

Zu Beginn der Reaktion folgt die Amplifikation einem weitgehend exponentiellen Verlauf bei dem idealerweise in jedem Zyklus eine Verdopplung der DNA erfolgt (2^t) und kann somit durch Gleichung 4.1 beschrieben werden. Dabei beschreibt N_0 die Ausgangsmenge des Templates und N_t die Produktmenge zum Zyklus t .

$$N_t = N_0 \cdot 2^t \quad (4.1)$$

Mit der Zeit geht die exponentielle in eine lineare Vermehrung über und kommt schließlich ganz zum Stillstand. Grund hierfür sind inhibitorische Produkte die während der PCR akkumulieren, der Verbrauch von Primern und die Zerstörung der Polymerase durch die hohen Temperaturen. Da die Amplifikation zu Beginn der PCR noch weitgehend exponentiell und mit der größten Effizienz verläuft, werden Kinetiken in diesem Bereich gemessen. Mit dem Threshold-Cycle (C_t) wird für jede Probe der Zyklus bestimmt, bei dem sich die Fluoreszenz gerade deutlich von der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Zusätzlich benötigt man ein Kontrollgen, einen sogenannten Housekeeper, der im untersuchten Organismus unter den gegebenen Bedingungen möglichst konstant exprimiert wird.

Auf diesen Housekeeper werden alle Proben normalisiert, um sie miteinander vergleichen zu können. Als Housekeeper für mRNA-Expressionsanalysen wurde in dieser Arbeit 18S rRNA verwendet. Zur Bestimmung der relativen Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Proben berechnet man nun die bestimmte Amplifikatmenge jeder Probe relativ zur unverdünnten Kontrolle sowohl für das zu untersuchende Gen als auch für den Housekeeper (4.2). Nach Normalisierung durch das Housekeepinggen können die Proben semiquantitativ verglichen werden.

$$\frac{\left[\frac{\text{Testgen:Probe}}{\text{Testgen:Kontrolle}} \right]}{\left[\frac{\text{Housekeeper:Probe}}{\text{Housekeeper:Kontrolle}} \right]} \quad (4.2)$$

Setzt man in Gleichung 4.2 die berechneten Produktmengen nach 4.1 ein und vernachlässigt N_0 für semiquantitative Analysen ergibt sich folgende Gleichung 4.3.

$$\frac{\left[\frac{2^{C_t \text{ Testgen:Probe}}}{2^{C_t \text{ Testgen:Kontrolle}}} \right]}{\left[\frac{2^{C_t \text{ Housekeeper:Probe}}}{2^{C_t \text{ Housekeeper:Kontrolle}}} \right]} = \frac{2^{(C_t \text{ Testgen:Kontrolle} - C_t \text{ Testgen:Probe})}}{2^{(C_t \text{ Housekeeper:Kontrolle} - C_t \text{ Housekeeper:Probe})}} \quad (4.3)$$

Da in der Realität die Effizienz einer PCR nicht ideal ist (d.h.=2) und abhängig von Primerpaar und Amplikon variieren kann, muss diese mit in die Berechnung mit einbezogen werden. Bei einer maximalen Effizienz von 100% ist $E=1$, woraus sich Gleichung 4.4 ergibt.

$$N_t = N_0 \cdot (E + 1)^t \quad (4.4)$$

In Gleichung 4.3 eingesetzt berechnet sich die relative Menge an Transkript nun nach 4.5.

$$\frac{(E_{\text{Testgen}} + 1)^{(C_t \text{ Testgen:Kontrolle} - C_t \text{ Testgen:Probe})}}{(E_{\text{Housekeeper}} + 1)^{(C_t \text{ Housekeeper:Kontrolle} - C_t \text{ Housekeeper:Probe})}} = \frac{(E_{\text{Testgen}} + 1)^{(\Delta C_t \text{ Testgen})}}{(E_{\text{Housekeeper}} + 1)^{(\Delta C_t \text{ Housekeeper})}} \quad (4.5)$$

Zur Berechnung der Effizienz wird für jedes Primerpaar mit einer Kontrolle eine interne Standardkurve über mehrere Logstufen pipettiert. Durch die lineare Abhängigkeit des C_t -Wertes vom Logarithmus der Ausgangsmenge N_0 des Templates gilt am Threshold-Cycle 4.6:

$$\begin{aligned} N_{C_t} &= N_0 \cdot E^{C_t} \\ \log N_{C_t} &= \log N_0 + \log E^{C_t} = \log N_0 + C_t \log E \\ C_t &= -\frac{1}{\log E} \cdot \log N_0 + \frac{N_{C_t}}{\log E} \end{aligned} \quad (4.6)$$

Da dies einer Geradengleichung vom Typ $y = m \cdot x + t$ entspricht kann die Effizienz aus

der Steigung berechnet werden (Abb. 4.3). Bei einer optimalen Effizienz von 2 würde sich aus der Gleichung eine Steigung von -3,32192809 ergeben. Die Steigung der Eichkurve gibt also die Effizienz der PCR-Reaktion wieder was für die Normalisierung wichtig ist.

$$\begin{aligned} m &= \frac{-1}{\log E} \\ \log E &= \frac{-1}{m} \\ E &= 10^{\frac{-1}{m}} \end{aligned} \quad (4.7)$$

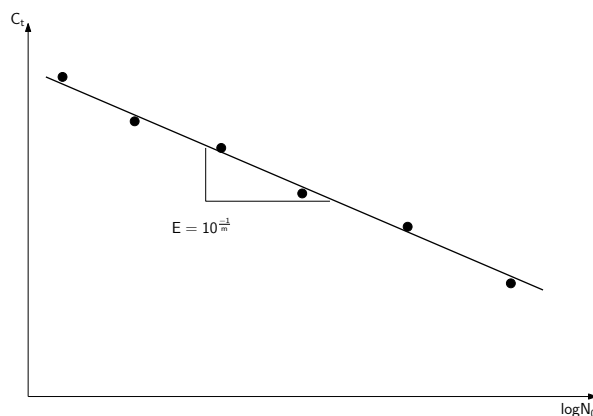


Abbildung 4.3: **Berechnung der Effizienz aus der Steigung.** Die Punkte entsprechen den C_t -Werten der Verdünnungsreihe. Die Regressionsgerade dient zur Berechnung der Effizienz aus der Steigung des linear-logarithmischen Zusammenhangs zwischen Threshold-Cycle und der Ausgangsmenge des Templates N_0 .

4.2.4 Klonieren von PCR-Produkten

Um die Spezifität von Primern zu kontrollieren, die sehr homologe Sequenzabschnitte amplifizieren, wie z.B. die Laktatdehydrogenasen A, B und C, wurde eine normale PCR mit diesen Primern durchgeführt. Die Taq DNA-Polymerase synthetisiert an die 5'-Enden der Amplifikate einen A-Überhang, was zur Klonierung in einen fertigen T-Vektor (TOPO TA Cloning®-Kit, Invitrogen) nach Protokoll des Herstellers genutzt wurde. Nach Transformation und Anzucht in *E. coli* TOP 10 wurden die Vektoren per Miniprep aufgereinigt und zur Sequenzierung mit vektorspezifischen Primern gegeben.

4.2.5 Restriktionsverdau

Restriktionsverdau wurden durchgeführt, um das Vorhandensein und die Orientierung von Inserts in Plasmiden zu überprüfen. Testverdau wurden für 2 Stunden bei 37 °C in einem Volumen von

20 µl durchgeführt.

Reaktionsansatz:	DNA	× µl [0,2-1 µg]
	Enzym	5 U/µg DNA
	10× Puffer	2 µl
	H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl

4.2.6 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde benutzt, um DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge aufzureinigen, aufzutrennen und für weitere Versuche verfügbar zu machen. Dazu wurde die benötigte Menge Agarose (Tab. 4.1) zu einem entsprechenden Volumen an TAE-Puffer in einen Erlenmeyerkolben gegeben und in der Mikrowelle aufgekocht (bei voller Leistung ca. 1 min/100 ml Lösung), bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte.

Fragmentgröße [kb]	Agarosekonzentration [%]
0,1 - 0,2	2,0
0,2 - 0,3	1,5
0,4 - 0,6	1,2
0,5 - 0,8	0,9
0,8 - 1,0	0,7

Tabelle 4.1: Agarosegelkonzentration bezüglich der DNA-Fragmentgröße

Nachdem die Lösung auf ca. 60 °C abgekühlt war, wurde Ethidiumbromid zugegeben und die Lösung in eine Gelkammer gegossen. Nach dem Aushärten wurde das Gel in eine Gelelektrophoresekammer überführt und vollständig mit TAE-Puffer bedeckt. Die DNA Proben wurden 4:1 mit einem 5× DNA Gelladepuffer gemischt und in die entsprechenden Kammern pipettiert. Bei jedem Agarosegel lief ein 1 kb plus DNA Standard (Invitrogen) mit. Je nach Fragmentgröße liefen die Gele zwischen 40 und 100 Volt für ca. 30 min - 3 h.

4.2.6.1 Benötigte Puffer und Lösungen

▪ 50× TAE-Puffer

Tris	252,3 g
NaOAc/HOAc pH 7,8	20,5 g
EDTA	18,5 g
Mit H ₂ O ad 1000 ml	

▪ 0,5 M EDTA-Lösung

EDTA/NaOH pH 8,0 18,6 g

Mit H₂O ad 100 ml▪ 5x DNA Loading-Dye

Tris/HCl pH 7,8 500 µl

20 % SDS 500 µl

0,5 M EDTA pH 8,0 1 ml

Glycerin 4 ml

Bromphenolblau 10 mg

Mit H₂O ad 10 ml, Lagerung bei 4 °C

4.2.7 Aufreinigung von DNA per Gelextraktion

Die DNA wurde in einem Agarosegel, dem Ethidiumbromid zugegeben wurde, aufgereinigt und nach Fragmentgröße aufgetrennt. Die entsprechenden Banden wurden unter schwachem UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem QIAEX II Gel Extraction-Kit (Qiagen) nach beiliegendem Protokoll aufgereinigt.

4.2.8 Sequenzierung

DNA-Fragmente wurden in einen fertigen T-Vektor (TOPO TA Cloning® Kit, Invitrogen) kloniert und nach Transformation und Anzucht in *E. coli* TOP 10 per Plasmidisolation isoliert. Die Plasmide wurden von Geneart (Regensburg, Deutschland) mit vektorspezifischen Primern sequenziert.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

Expressionsanalysen auf Proteinebene wurden anhand von SDS-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) in Kombination mit Western-Blots durchgeführt. Dies erlaubt eine schnelle und valide Verifizierung der RT-qPCR basierenden mRNA-Expressionsanalysen auf Proteinebene. Bei der SDS-PAGE nutzt man die Eigenschaft von Proteinen Sodiumdodecylsulfat (SDS) zu binden, was zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen (Ladung~Masse) führt. SDS denaturiert in Kombination mit dem im Probenpuffer enthaltenem β -Mercaptoethanol Proteine und unterbindet damit Protein-Protein-Wechselwirkungen (Tertiär-/Quartärstrukturen). Dadurch unterscheiden sich die Proteine nur noch in ihrer Größe bzw. ihrem Molekulargewicht. Im SDS-Gel wandern die Proteine entsprechend der angelegten Spannung zum Pluspol und werden durch den Molekularsiebeffekt der

Polyacrylamidmatrix ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Im Western-Blot werden die Proteine elektrophoretisch auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen. Auf der Membran können Proteine durch spezifische Antikörper gebunden und mit Farbreaktionen sichtbar gemacht werden, was Aussagen über Vorhandensein und Menge eines Proteins erlaubt.

4.3.1 Proteinlysate in RIPA-Puffer

Zur Extraktion von Gesamtprotein wurden Zellen in Kulturschalen zweimal mit PBS gewaschen und mit 100 µl RIPA-Puffer pro 5×10^6 Zellen überschichtet. Dann wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Platten geschabt und mit einer Pipette in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach 1 Minute vortexen wurden die Zellen 20 Minuten auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und anschließend nochmals 1 Minute gevortext. Hierauf folgte eine Zentrifugation (15 min, $13000 \times g$) und anschließende Aliquotierung der Überstände. Diese wurden zur Proteinbestimmung verwendet und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

4.3.2 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der DC Protein Assay von Biorad (München, Deutschland) verwendet. Der Assay basiert auf dem Lowry-Test, bei dem Protein mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex bildet (Biuret-Reaktion). Diese gebundenen Cu^{2+} -Ionen werden zu Cu^{+} -Ionen reduziert und bilden zusammen mit einem Folin-Reagenz einen blauen Komplex, der als Maß der Proteinkonzentration dient. Zur Konzentrationsbestimmung dient eine interne Standardkurve bekannter Konzentrationen aus BSA.

4.3.3 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurde das diskontinuierliche Lämmli-System verwendet. Bezüglich des Molekulargewichts der in dieser Arbeit untersuchten Proteine wurden 12 %ige SDS-Gele (optimal für $M_{\text{Protein}}=20\text{--}60\text{ kDa}$) verwendet.

Die Gele wurden meist einen Tag vor dem Lauf gegossen. Zum Gießen des Trenngels wurde Untergelstammlösung⁶ mit APS (5 µl/1 ml Stammlösung) und TEMED (1 µl/1 ml Stammlösung) als Polymerisationskatalysator vermischt und sofort in die Gelkammern gegossen. Anschließend wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 30 min Polymerisationszeit wurde der Isopropanol abgegossen, zweimal mit verdünntem Untergelpuffer gespült und das Obergel mit der

⁶6 ml für kleines Gel, 12 ml für großes Gel

Obergelstammlösung⁷, APS und TEMED nach selbem Mischungsverhältnis darauf gegossen. Die Gele wurden bis zu 5 Tage, eingeschlagen in einem mit Untergelpuffer⁸ getränkten Papierhandtuch, im Kühlschrank aufbewahrt.

Zur Elektrophorese wurden die Gele in die Kammern gesetzt und vollständig mit Lämmli-Puffer überschichtet. Entsprechende Mengen der Proteinlysate wurden mit 2× SDS-Probenpuffer vermischt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz auf Eis gestellt, abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Eine Geltasche wurde mit 5 µl Biorad Kaleidoskop Marker beladen um das Molekulargewicht der untersuchten Proteine abschätzen zu können.

Zum Durchlaufen des Sammelgels wurde eine Spannung von 60 V angelegt. Hatten die Proben das Trenngel erreicht wurde die Spannung auf 120-140 V erhöht, bis der Marker den unteren Rand des Gels erreichte.

4.3.3.1 Benötigte Puffer und Lösungen

- Acrylamid-Stammlösung

Acrylamid 146 g

mit H₂O ad 500 ml, Lösung über Nacht im Kühlraum rühren und anschließend filtrieren

- Untergelpuffer

Tris/HCl 90,83 g

mit H₂O ad 500 ml

- Obergelpuffer

Tris/HCl 30 g

mit H₂O ad 500 ml

- SDS-Stammlösung

SDS 10 g

mit H₂O ad 100 ml

- 1 M Tris-Puffer

Tris/HCl 13 g

mit H₂O ad 100 ml

⁷3 ml für kleines Gel, 6 ml für großes Gel

⁸1:3 mit H₂O verdünnt

- 2x SDS-Probenpuffer

Glycerin	10 ml
Tris-Puffer	5 ml
SDS	2 g
β -Mercaptoethanol	5 ml
Bromphenolblau	10 mg
mit H ₂ O ad 50 ml	

- Ammoniumpersulfat-Lösung

Ammoniumpersulfat	100 mg
mit H ₂ O ad 1 ml, im Kühlschrank max. 5 d haltbar	

- 50x TAE-Puffer

Tris-Base	242 g
Essigsäure	57,1 ml
0,5M EDTA pH 8,0	100 ml
mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen	

- 5x Lämmli-Elektrodenpuffer

Tris	15 g
Glycin	216 g
SDS	15 g
mit H ₂ O ad 3000 ml	

- Gelstammlösungen

	12% Trenngel	5% Sammelgel
Obergelpuffer	-	25 ml
Untergelpuffer	25 ml	-
SDS (10 %)	1 ml	1 ml
Acrylamid (30 %)	40 ml	16,65 ml
H ₂ O _{bidest}	ad 100 ml	ad 100 ml

4.3.4 Western-Blot

Im Anschluss an die SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet. Dazu wurde eine Halbtrockenzelle von Biometra (Göttingen, Deutschland) verwendet. Zu Beginn wurden je 3 Filterpapiere mit den jeweiligen Anodenpuffern A,B und C getränkt. Die

PVDF-Membran wurde durch kurzes Schwenken in Methanol aktiviert und anschließend in Anodenpuffer B geschwenkt. Die Blot-Kammer wurde nach folgendem Prinzip zusammengebaut:

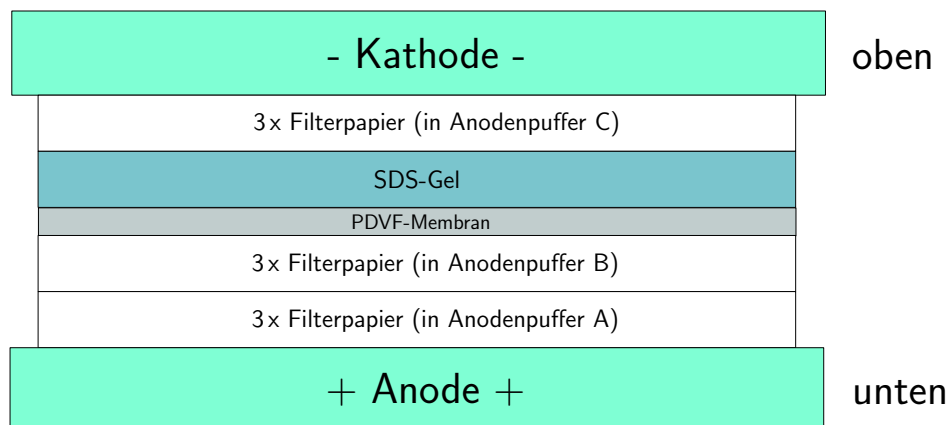


Abbildung 4.4: Schematischer Aufbau einer Western-Blot-Kammer

Geblottet wurde 60 min mit 0,8 mA pro cm² Fläche des Blotzuschnitts. Im Anschluss daran wurden die restlichen Proteinbindungsstellen der PVDF-Membran durch einstündiges Blocken in 5%iger Magermilchlösung abgesättigt. Die Immunfärbung erfolgte durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern⁹ (1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank) und dem ECL-Detektions-Kit (Buckinghamshire, Großbritannien). Nach dem Blotten und zwischen den Färbeschritten mit Antikörpern wurde 3 × 15 min mit TBST-Lösung gewaschen.

Zur Quantifizierung von Proteinen wurde als Referenz β -Aktin verwendet.

4.3.4.1 Benötigte Puffer und Lösungen

▪ Anodenpuffer A

Tris/HCl	36,3 g
Methanol	200 ml
mit H ₂ O ad 1000 ml	

▪ Anodenpuffer B

Tris/HCl	3,03 g
Methanol	200 ml
mit H ₂ O ad 1000 ml	

⁹1:1000-1:2500 verdünnt in 5%iger Magermilchlösung

- Anodenpuffer C

ε-Amino-n-Caprinsäure	5,2 g
Methanol	200 ml
mit H ₂ O ad 1000 ml	

- Block-Lösung

5 % Magermilchpulver in H₂O lösen und filtrieren, im Kühlschrank max. 3 Tage aufbewahren

- 2x TBS-Lösung

Tris/HCl	9,16 g
NaCl	35,1 g
mit H ₂ O ad 2000 ml	

- TBST-Lösung

1 ml Tween-20 auf 1000 ml TBS-Lösung

4.3.5 Tissuemicroarray

Tissuemicroarrays (TMAs) aus Geweben des Nierenzellkarzinoms (RCC) wurden am Institut für Pathologie der Universität Erlangen von Prof. Dr. Arndt Hartmann et al. angefertigt. Eine genaue Beschreibung zur Generierung von TMAs wurde von Bubendorf et al. publiziert [12]. Die Kohorte umfasste 249 RCC Patienten, davon waren 145 männlich, 83 weiblich und bei 21 war das Geschlecht unbekannt. Das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung war 62 Jahre (19–88). Die Proben wurden als 80 klarzellige, 66 papilläre, 73 chromophobe RCCs und 30 Oncocytome klassifiziert.

4.4 Zellbiologische Methoden

4.4.1 Zellkultur

4.4.1.1 Kultur und Passage von Zelllinien

Standardmäßig wurden Tumorzelllinien in RPMI 1640 oder DMEM (PAA, Cölbe, Deutschland) kultiviert. Den Medien wurden 10 % FCS (PAA, Cölbe, Deutschland), 2 mM L-Glutamin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco, Eggenstein, Deutschland) zugegeben. Alle 5-6 Tage wurden die Zellen passagiert und 1:10 in frisches Medium eingesät. Dabei wurden die Zellen zuerst einmal mit PBS gewaschen. Adhärente Zellen wurden durch Zu-

gabe von 1 ml Tryp/EDTA-Lösung¹⁰ und 5 min Inkubation im Brutschrank vom Flaschenboden gelöst. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden die Zellen in 9 ml Medium aufgenommen und abzentrifugiert (300×g, 8 min). Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgegossen, die Zellen in 1 ml Medium resuspendiert und neu ausgesät.

Inkubationsbedingungen: 37°C, 5 % (RPMI) bzw. 10 % (DMEM) CO₂

4.4.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität von Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in Trypanblau-Lösung¹¹ auf eine auszählbare Konzentration verdünnt. Durch die Trypanblau-Lösung lassen sich lebende von toten Zellen unterscheiden. Tote Zellen lagern aufgrund ihrer porösen Zellmembran Trypanblau ein und erscheinen unter dem Lichtmikroskop blau. Zum Zählen der Zellen wurde die Neubauer Zählkammer (Abb. 4.5) verwendet. Die Zellzahl wurde nach Gleichung 4.8 berechnet.

$$\text{Zellzahl/ml} = Z \cdot V \cdot 10^4 \quad (4.8)$$

Z = Durchschnitt der pro Eckquadrat gezählten Zellen (1 Eckquadrat besteht aus 16 Subquadraten und hat eine Fläche von 1 mm²)

V = Verdünnungsfaktor

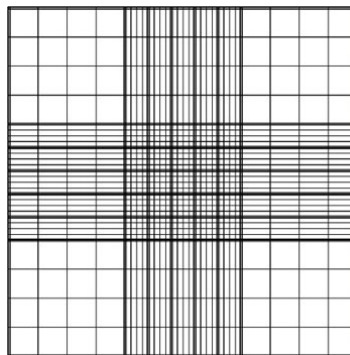


Abbildung 4.5: Neubauer-Zählkammer

4.4.1.3 Zellen einfrieren und auftauen

Zellen wurden geerntet und mit Medium auf eine Konzentration von $2-3 \times 10^6/800\mu\text{l}$ eingestellt. Anschließend wurden die Zellen in ein Kryoröhrchen pipettiert, in dem 160 μl DMSO und 640 μl FCS vorgelegt waren. Um eine langsame Temperaturerniedrigung zu gewährleisten wurden die

¹⁰0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS

¹¹0,2 % Trypanblau in PBS

Kryoröhrchen in mit Isopropanol gefüllten Kryobehältern über Nacht auf -80°C gestellt. Am nächsten Tag wurden die Zellen in normale Kryoboxen gestellt. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zelllinien in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, kurzzeitige Lagerung erfolgte bei -80°C .

4.4.2 Mykoplasmen-Test

Die Zelllinien wurden routinemäßig in regelmäßigen Abständen auf Kontamination mit Mykoplasmen getestet. Dazu wurde der MycoAlert® Mycoplasma detection-Assay (Cambrex, Rockland, USA) nach beiliegendem Protokoll verwendet.

4.4.3 Transfektionen

Die Transfektion ermöglicht es DNA in Zellen einzuschleusen und stabil in deren Genom zu integrieren. Diese Technologie wurde in der hier vorliegenden Arbeit verwendet, um die Expression der Laktatdehydrogenase A mit einem shRNA-Vektor in humanen und murinen Tumorzelllinien zu verringern. Zur Transfektion der Tumorzelllinien wurde Lipofectamine™ 2000 von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Die Methode basiert auf einer Komplexbildung der zu transfizierenden DNA mit kationischen Lipiden im ersten Schritt. Dieser DNA-Liposomen-Komplex wird im 2. Schritt zu den Tumorzellen pipettiert und durch Fusion mit der Zellmembran in die Zelle aufgenommen. Zur Transfektion von Mclm- und B16.SIY E12-Tumorzelllinien wurde das beiliegende Protokoll in der vorliegenden Arbeit folgendermaßen optimiert:

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion Antibiotika-frei in einer Konzentration von $0,5 \cdot 10^6/2\text{ml}$ Medium pro Transfektionsansatz in 6-Well-Platten ausgesät. Am folgenden Tag wurden zur Transfektion selbst folgende Ansätze vorbereitet:

Lipofektamin-Ansatz:

Je Transfektionsansatz wurde 250 μl OptiMEM (serumfreies Medium) mit 10 μl Lipofectamine™ 2000 gemischt und 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Plasmidansatz:

Je Transfektionsansatz wurde 250 μl OptiMEM (serumfreies Medium) mit 1,5 μg Plasmid-DNA¹² gemischt.

Dann wurden Lipofektamin- und Plasmidansatz miteinander vermischt und 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 2 ml Serum- und Antibiotika-freiem RPMI-Medium überschichtet. Im Anschluss daran wurde

¹²Aufreinigung mit Endotoxin-free Plasmid Midi-Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland), Lipofektion erfordert sehr reine, endotoxinfreie DNA

der 500 µl-Transfektionsansatz langsam auf die Zellen geträufelt. Nach 4 Stunden wurde zu dem Ansatz 250 µl FCS pipettiert und die Zellen über Nacht im Brutschank inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte ein Medienwechsel mit normalem Antibiotika-enthaltendem Medium. Plasmidspezifische Selektionsantibiotika wurden erst 1-2 Tage nach der Transfektion zugegeben um eine volle Expression der Resistenzgene zu gewährleisten.

4.4.4 Klonierung und Subklonierung von transfizierten Zelllinien

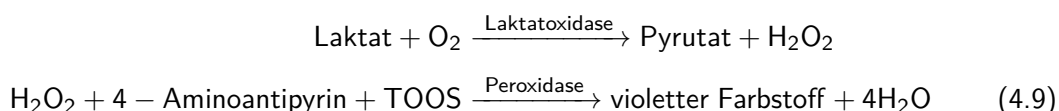
Nach der Transfektion wurden die Zellen zur Selektion positiver Klone 2-3 Wochen unter Antibiotika-Selektionsdruck gestellt. Dabei wurde für Mclm Blastidin in einer Konzentration von 4 µg/ml eingesetzt. Für B16.SIY E12 wurde zusätzlich G418 in einer Konzentration von 800 µg/ml eingesetzt, da diese Zelllinie, bereits vor Beginn der Nutzung, mit einem Plasmid transfiziert wurde, das ein G418-Resistenzgen trägt. Anschließend wurden die überlebenden Klone entsprechend der Expression des *GFP*-Gens im pGeneClip hMGFP-Plasmid in Zusammenarbeit mit Rüdiger Eder (AG Hoffmann/Edinger, Hämatologie/Onkologie, Universitätsklinikum Regensburg) mit einem Zellsorter in 96-Well-Platten gesortet (1 Zelle/Well). Nach 6-8 Wochen Kultur wurde das Sorten mit den angewachsenen Klonen wiederholt. Durch optische Betrachtung des Farbumschlags im Medium, bedingt durch den pH-Indikator, wurden hoch und niedrig Laktat-sezernierende Subklone vorausgewählt. Diese wurden anschließend auf die Expression der LDHA auf mRNA-Ebene (RT-qPCR) und Proteinebene (Western-Blot) untersucht sowie Proliferations- und Laktatsekretionsmessungen unterzogen. Für weitere Versuche wurden nur Subklone verwendet, die im Vergleich zu Kontrollen, bei ähnlichem Proliferationsverhalten eine geringere Laktatsekretion zeigten.

4.4.5 ³H-Thymidin Assay (Proliferationstest)

Das Proliferationsvermögen von Zellen wurde über den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin gemessen. Dazu wurden die Zellen in 96-Well-Platten in einer Konzentration von 25000/200 µl per Well (n=5) ausgesät. Nach 2 h im Brutschrank waren die Zellen adhärent und es wurde 0,5 µCi (=0,00185 MBq) [Methyl-³H]-Thymidin zugegeben. Die Zellen wurden 24 h im Brutschrank inkubiert und anschließend mit einem Wallac-Harvester (PerkinElmer, Gaithersburg, MD) auf UniFilter-Platten übertragen. Die eingebaute Radioaktivität galt als Maß für die Proliferationsrate und wurde mit einem Wallac Betaplate-Counter (PerkinElmer, Gaithersburg, MD) gemessen.

4.4.6 Laktatmessung in Zellkulturüberständen

Die Messung der Laktatkonzentration in Zellkulturüberständen erfolgte an einem AVIDA 1650 mittels eines enzymatischen Tests in der klinischen Chemie (Universitätsklinikum Regensburg). Die Methode basiert darauf, dass die Laktatkonzentration proportional zur ablaufenden Reaktion (4.9) ist. Dabei wird Laktat durch Laktatoxidase zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid oxidiert. Das entstandene Wasserstoffperoxid bildet zusammen mit einem Chromogen in Gegenwart einer Peroxidase einen Farbstoff der mittels Spektrophotometrie gemessen werden kann.



TOOS = N-Ethyl-N-(2hydroxy-3-sulfopropyl)m-toluidin

4.4.7 O₂- und pH-Kinetik mit dem SDR SensorDish®-Reader

Zur Untersuchung des Energiestoffwechsels in Tumorzelllinien wurden Sauerstoffverbrauch und pH-Änderung kinetisch analysiert. Dazu wurde der SDR SensorDish®-Reader der Firma PreSens Precision Sensing GmbH (Regensburg, Germany) verwendet.

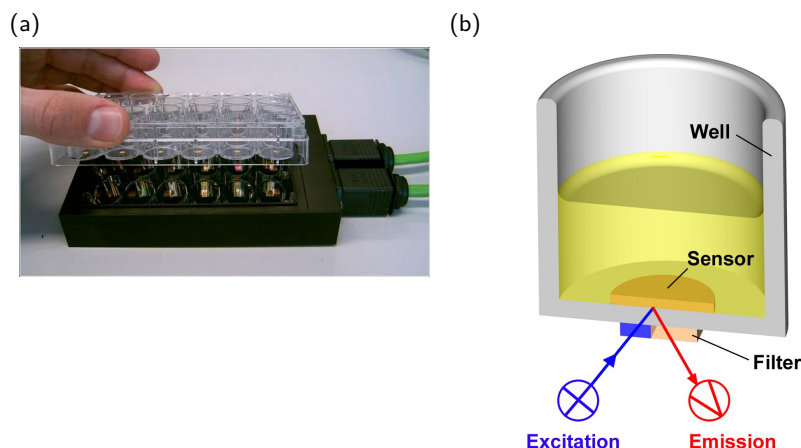


Abbildung 4.6: **PreSens-Technologie.** Dargestellt ist das Prinzip und die Funktionsweise des SDR SensorDish®-Readers der Firma PreSens. **(a)** zeigt eine Messeinheit mit dazugehöriger 24-Well-Platte. Diese Messeinheit befindet sich während der Messung im Brutschrank und ist über ein Kabel mit einem Computer verbunden. **(b)** veranschaulicht das Prinzip der optischen Messung. Am Boden jedes Wells befindet sich ein optischer Sensor, in den ein lumineszenter Farbstoff eingelagert ist, dessen Analyten-sensitive Emission vom SensorDish® Reader erfasst wird. Die Signale werden von der Software auf dem Computer in definierte Sauerstoff- bzw. pH-Einheiten umgerechnet.

Diese Technologie basiert auf optischen Sensoren zur Sauerstoff (OxoDish®)- bzw. pH (HydroDish®)-Messung, die auf dem Boden jedes Wells einer 24-Well-Platte fixiert sind (Abb. 4.6b). Die Sensoren bestehen aus einem lumineszenten Farbstoff, der in ein Analyten-sensitives Polymer eingelagert ist. Diese werden vom SensorDish®-Reader, auf dem die 24-Well-Platte während der Messung platziert wird (Abb. 4.6a), ausgelesen und die Daten von einer zugehörigen Software verarbeitet. Die Signale werden von der Software über Kalibrierungsparameter in definierte Sauerstoff- bzw. pH-Einheiten umgerechnet. Die Messeinheit (24-Well-Platte + SDR SensorDish®-Reader) befand sich während der gesamten Messung im Brutschrank und war über ein Kabel mit einem Computer verbunden.

5 Ergebnisse

5.1 Immunsuppressive Effekte von Laktat auf Immunzellen

In Tumoren sind verschiedene Stoffwechselwege dysreguliert. Dadurch kommt es u.a. auch zu einer Sekretion bestimmter Metabolite, die das Immunsystem negativ modulieren können. Solche „Immunescape“-Mechanismen begünstigen den Tumor in seinem Wachstum, da er sich dem Angriff des Immunsystems entziehen kann. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass ein Stoffwechselendprodukt des Glukosemetabolismus, Laktat, sowohl die Differenzierung von dendritischen Zellen als auch die Aktivierung von T-Zellen *in vitro* inhibiert [36]. In der hier vorliegenden Arbeit wurden unter anderem Effekte von Laktat auf humane Monozyten analysiert [28].

Wir konnten zeigen, dass LPS-stimulierte Monozyten bei Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Milchsäure eine verminderte TNF-Sekretion aufweisen (Abb. 5.1a).

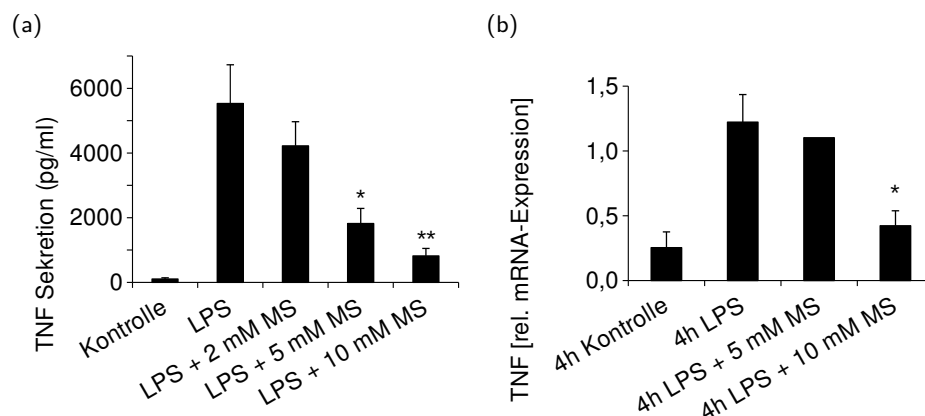


Abbildung 5.1: **Milchsäure inhibiert die TNF-Sekretion in Monozyten.** Frisch isolierte humane Monozyten wurden für 18-20 h ohne/mit 2-10 mM Milchsäure (MS) inkubiert und mit 100 ng/μl LPS stimuliert. **(a)** TNF wurde in den Überständen per ELISA bestimmt. Die Inkubation mit 5 mM und 10 mM Milchsäure zeigte eine statistisch signifikante Inhibition der TNF-Sekretion im Vergleich zur LPS-Kontrolle (Student's t-Test, $p < 0,05$ *, $p < 0,005$ **). Fehlerbalken beziehen sich auf 5 oder mehr unabhängige Experimente. **(b)** Die relative TNF-Expression wurde nach 4 h per RT-qPCR bestimmt. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert. Nur 10 mM Milchsäure zeigte eine statistisch signifikante Inhibition der TNF mRNA-Expression nach 4 h (Student's t-Test, $p < 0,01$ *). Fehlerbalken beziehen sich auf 4 unabhängig durchgeführte Experimente.

Eine signifikante Reduktion der TNF-Sekretion zeigte sich bei Konzentrationen von 5 mM und 10 mM Milchsäure. Parallel dazu wurde in den Monozyten die mRNA-Expression von TNF per RT-qPCR bestimmt. Die Analyse bestätigte eine signifikant erniedrigte TNF-Sekretion der Monozyten bei Inkubation mit 10 mM Milchsäure (Abb. 5.1b).

5.2 Effekte von Laktat auf Tumorzellen

Das Glioblastom ist ein hoch glykolytischer Tumor. Daher sind sowohl parakrine als auch autokrine Effekte von Laktat auf die Tumorzellen selbst denkbar. Wir untersuchten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Peter Hau (Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universitätsklinikum Regensburg) die Wirkung von Milchsäure auf Gliomzellen [6]. Per RT-qPCR wurde die relative mRNA-Expression von TGF- β in HTZ-349 Gliomzelllinien untersucht, die mit Milchsäure in Konzentrationen von 10-30 mM behandelt wurden (Abb. 5.2). Dabei zeigte sich eine deutliche Induktion der TGF- β -Expression in Abhängigkeit von der Milchsäurekonzentration (Abb. 5.2). Da TGF- β ebenfalls Immunreaktionen wie z.B. die Migration moduliert, ist hiermit auch eine indirekte Immunregulation durch Laktat möglich.

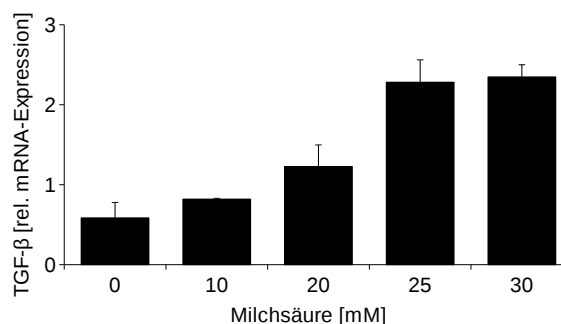


Abbildung 5.2: **Milchsäure reguliert die TGF- β 2-mRNA.** HTZ-349 Gliomzelllinien wurden 48h mit Milchsäure in den Konzentrationen 10, 20, 25 und 30 mM behandelt. Die relative mRNA-Expression von TGF- β 2 wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Fehlerbalken beziehen sich auf RT-qPCR-Analysen von 3 unabhängigen RNA-Präparationen. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert.

5.3 Metabolische Charakterisierung von humanen Tumorzelllinien und primärem Tumormaterial

Laktat spielt somit eine wichtige Rolle für die Regulation Tumor-infiltrierender Immunzellen als auch für die Regulation wichtiger Faktoren, die die Tumordinfiltration steuern. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, ein metabolisches Profil verschiedener Stoffwechselwege in Tu-

morzelllinien zu erstellen. Seit Otto Warburg gibt es viele einzelne Untersuchungen zum Glukosemetabolismus in Tumoren. Zusammenhängende Analysen in Form eines metabolischen Profils fehlen jedoch.

Zunächst wurde in Tumorzelllinien die Expression entsprechender Gene auf mRNA-Ebene untersucht. Neben typischen Genen des Glukosemetabolismus (*GLUT1*, *GLUT3*, *GLUT14*, *LDHA*, *LDHB*) und des Laktattransports (*MCT1*, *MCT4*), wurden auch weitere Gene untersucht, für die eine Veränderung in Tumoren beschrieben ist. Hierzu zählen zum Beispiel Gene des Aminosäurestoffwechsels (*ARG1*, *ARG2*, *iNOS*, *IDO*) und des Lipidstoffwechsels (*COX1*, *COX2*). Als Kontrolle wurde die Expression der entsprechenden Gene in Tumorzellen mit der Expression in nicht transformierten Normalzellen des entsprechenden Gewebes bzw. in Immunzellen verglichen. Der Sauerstoffverbrauch und die Ansäuerung der Zellkulturen wurde mittels SDR SensorDish®-Reader der Firma PreSens dokumentiert. Laktat wurde parallel in Zellkulturüberständen nachgewiesen.

5.3.1 Der „Warburg-Effekt“ in humanen Tumorzelllinien

Unter dem „Warburg-Effekt“ versteht man die Beobachtung, dass Tumorzelllinien ihre Energie primär über die Glykolyse und die darauffolgende Umwandlung des Pyruvat zu Laktat gewinnen. Da dies auch stattfindet, wenn genügend Sauerstoff zur Oxidation des Pyruvats zur Verfügung steht, wird dieser Effekt auch als „aerobe Glykolyse“ bezeichnet. Dies sollte potentiell zu einer starken Expression von Glukosetransportern in der Tumorzelle führen. Somit untersuchten wir die Expression der Glukosetransporter *GLUT1*, *GLUT3* und *GLUT14* in unterschiedlichen Tumorzelllinien (Abb. 5.3).

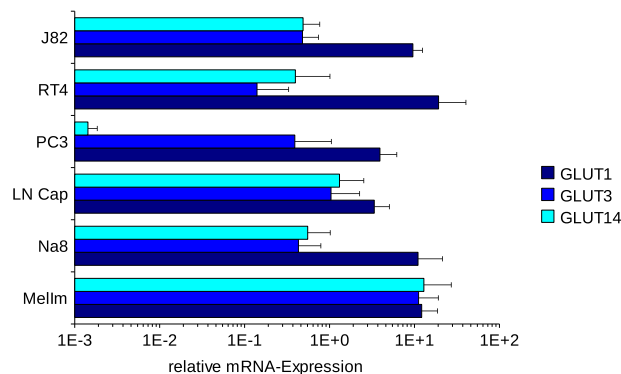


Abbildung 5.3: **mRNA-Expression von Glukosetransportern in humanen Tumorzelllinien.** Die Expression wichtiger Glukosetransporter wurde in verschiedenen humanen Tumorzelllinien (J82/RT4: Urothelkarzinom-Zelllinien, PC3/LN Cap: Prostatakarzinom-Zelllinien, Na8/Mellm: Melanom-Zelllinien) untersucht. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Fehlerbalken beziehen sich auf technische Replikate einer repräsentativen RNA-Präparation aus mindestens drei Experimenten. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert.

Dazu wurde RNA aus Tumorzelllinien isoliert und in einer RT-PCR zu cDNA umgeschrieben. Per RT-qPCR wurde die relative mRNA-Expression (gegen 18s rRNA normalisiert) quantifiziert.

Alle Tumorzelllinien zeigten eine deutliche Expression der drei Glukosetransporter. Besonders in der humanen Melanomzelllinie Mellm waren alle Glukosetransporter stark exprimiert, in den übrigen analysierten Zelllinien variierte die Expression der Glukosetransporter stärker als bei Mellm. GLUT1 wurde in allen Linien am stärksten exprimiert.

5.3.2 Analyse der Laktatdehydrogenase A und B sowie der Laktattransporter MCT1 und MCT4 in humanen Tumorzelllinien

Da die Laktatdehydrogenase, die die Umwandlung des Pyruvats in Laktat katalysiert, eines der Schlüsselenzyme der aeroben Glykolyse darstellt, wurde die mRNA-Expression der relevanten Gene für die Laktatdehydrogenase A und B (*LDHA*, *LDHB*) bestimmt. Alle Tumorzelllinien zeigten eine hohe Expression beider LDHs (Abb. 5.4).

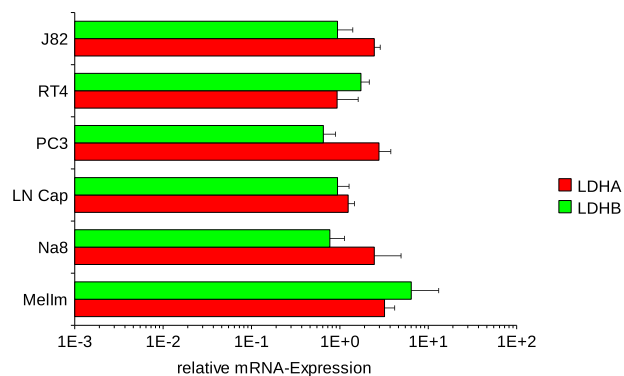


Abbildung 5.4: **mRNA-Expression von Laktatdehydrogenase A und B in humanen Tumorzelllinien.** Die Expression der wichtigsten Laktatdehydrogenasen A und B wurde in verschiedenen humanen Tumorzelllinien (J82/RT4: Urothelkarzinom-Zelllinien, PC3/LN Cap: Prostatakarzinom-Zelllinien, Na8/Mellm: Melanom-Zelllinien) untersucht. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Fehlerbalken beziehen sich auf technische Replikate einer repräsentativen RNA-Präparation aus mindestens drei Experimenten. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert.

Der größte Teil des im Tumorstoffwechsel gebildeten Pyruvats wird in Laktat umgewandelt, was nach dem Ausschleusen aus der Zelle zu einer Anreicherung im Tumormilieu führt. Die Monocarboxylattransporter MCT1 und MCT4 sind für den Transport des Laktats aus der Zelle verantwortlich und wurden hier analysiert (Abb. 5.5).

Auch die beiden analysierten Monocarboxylattransporter wurden in den untersuchten Zelllinien exprimiert, aber heterogener als LDHA und LDHB. Andere MCTs wurden ebenfalls detektiert, aber keine tumorspezifischen Unterschiede gefunden (ohne Abb.).

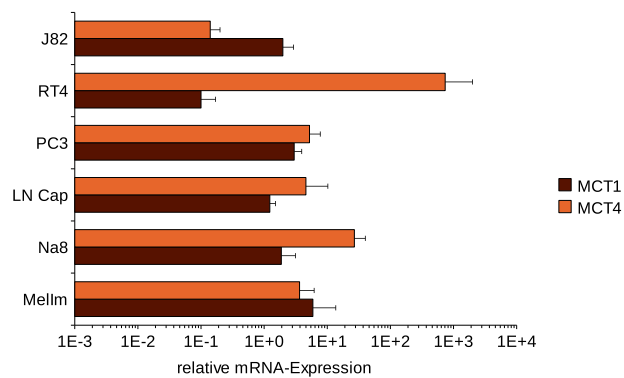


Abbildung 5.5: **mRNA-Expression von Laktattransportern in humanen Tumorzelllinien.** Die Expression der Monocarboxylattransporter MCT1 und MCT4 wurde in verschiedenen humanen Tumorzelllinien (J82/RT4: Urothelkarzinom-Zelllinien, PC3/LN Cap: Prostatakarzinom-Zelllinien, Na8/Mellm: Melanom-Zelllinien) untersucht. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Fehlerbalken beziehen sich auf technische Replikate einer repräsentativen RNA-Präparation aus mindestens drei Experimenten. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert.

5.3.3 Analyse verschiedener Enzyme der oxidativen Phosphorylierung in humanen Tumorzelllinien

Tumore, die sich durch Veränderungen im Glukosestoffwechsel charakterisieren lassen, weisen häufig eine Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung auf. So zeigen zahlreiche Krebszellen Defekte in mitochondrialen Enzymen. Deshalb analysierten wir auch die Expression der Pyruvatdehydrogenase und der Malatdehydrogenase (Abb. 5.6).

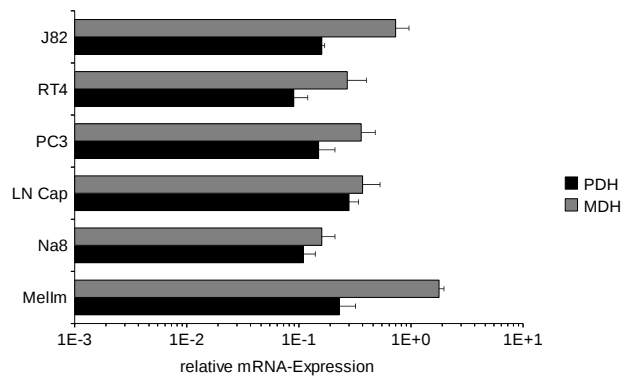


Abbildung 5.6: **mRNA-Expression der Pyruvatdehydrogenase und Malatdehydrogenase in humanen Tumorzelllinien.** Die Expression der Pyruvatdehydrogenase (PDH) und Malatdehydrogenase (MDH) wurde in verschiedenen humanen Tumorzelllinien (J82/RT4: Urothelkarzinom-Zelllinien, PC3/LN Cap: Prostatakarzinom-Zelllinien, Na8/Mellm: Melanom-Zelllinien) untersucht. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Fehlerbalken beziehen sich auf technische Replikate einer repräsentativen RNA-Präparation aus mindestens drei Experimenten. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert.

Die Pyruvatdehydrogenase (PDH) katalysiert die Umsetzung des Pyruvat in Acetyl-CoA und befindet sich somit an der Schnittstelle zwischen anaerober Fermentation und oxidativer Phosphorylierung. Die Malatdehydrogenase (MDH) katalysiert die Umsetzung von Oxalacetat zu Malat, was in darauffolgenden Reaktionen, durch Umsetzung zu Pyruvat, die Bereitstellung von NADPH/H⁺ sichert.

Sowohl die PDH als auch die MDH waren in allen Tumorzellen auf mRNA-Ebene deutlich exprimiert, was darauf hindeutet, dass die Atmung in diesen Tumorzellen nicht inhibiert ist.

5.3.4 Messung des Sauerstoffverbrauchs humaner Tumorzelllinien mittels SDR SensorDish®-Reader

Um die Atmungsaktivität im Vergleich zur mRNA-Expression von PDH und MDH zu untersuchen, wurden in den Tumorzelllinien Mellm, PC3 und LN Cap mit einem SDR SensorDish®-Reader der Firma PreSens der Sauerstoffverbrauch sowie die pH-Änderung in Zellkultur gemessen (Abb. 5.7). Liegen Mutationen bzw. Veränderungen im Glukosemetabolismus und im Energiestoffwechsel vor, sollte dies Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch bzw. die Ansäuerung des Kulturmediums haben.

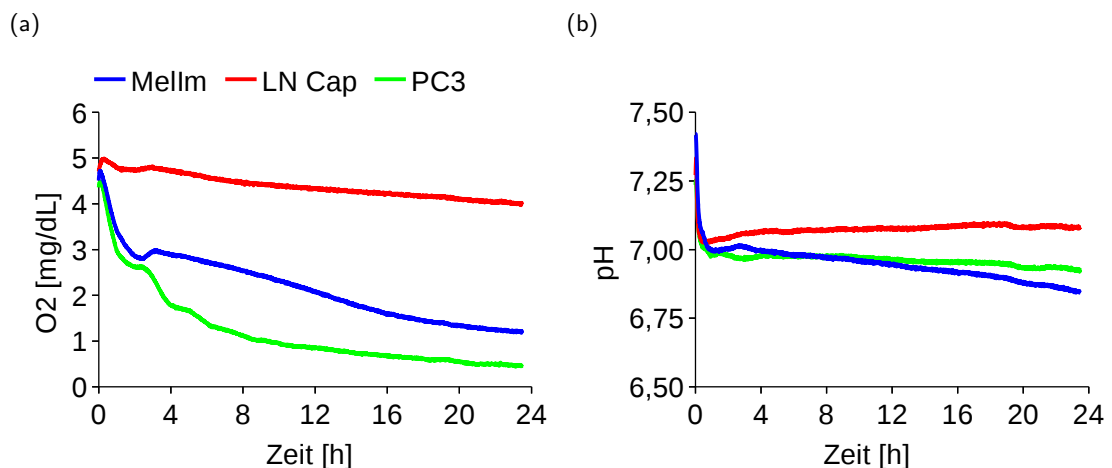


Abbildung 5.7: **Sauerstoffverbrauch und pH-Änderung während der Kultur von humanen Tumorzelllinien.** Es wurde der Sauerstoffverbrauch (a) und die pH-Änderung (b) während der Kultur von Tumorzelllinien mit einem SDR SensorDish®-Reader der Firma PreSens gemessen. Die Tumorzelllinien Mellm, LN Cap und PC3 wurden als Monolayer in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/ml in den 24-Well PreSens-Platten ausgesät und über einen Zeitraum von 24 h gemessen. Gezeigt ist eine repräsentative Messung aus drei Experimenten

Bei der Untersuchung verschiedener Tumorzelllinien beobachteten wir, dass die meisten Zelllinien trotz hoher Genexpression glykolytischer Enzyme (GLUT1, LDHA, LDHB) deutliche Atmungsaktivität aufwiesen. Wie in Abb. 5.7a zu sehen ist, verbrauchte LN Cap sehr wenig Sauerstoff.

Auch der pH-Wert blieb hier relativ konstant (Abb. 5.7b). Mellm wies im Gegensatz dazu einen weitaus höheren Sauerstoffverbrauch im Medium auf. Auch der pH-Wert sank über die 24 Stunden stärker ab als bei LN Cap. PC3 folgt einem ähnlichen Verlauf wie Mellm und zeigt einen hohen Sauerstoffverbrauch sowie eine stärkere pH-Erniedrigung verglichen mit LN Cap.

5.3.5 Analyse des Aminosäurestoffwechsels in humanen Tumorzelllinien

Eine bedeutende Rolle in der Tumorummunologie spielt der Aminosäurestoffwechsel, besonders der Arginin- und Tryptophanstoffwechsel. Die Arginase (ARG) ist für die Umsetzung von Arginin zu Ornithin und Harnstoff verantwortlich. Das gebildete Ornithin ist wichtig für die Kollagen- und Polyaminsynthese. Außerdem führt die Bildung von NO aus L-Arginin durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) zu Vasodilatation. Freigesetzte reaktive Stickstoffverbindungen haben zudem in hohen Konzentrationen auch einen zytotoxischen Effekt.

Ein weiteres wichtiges Enzym, das in Tumoren häufig überexprimiert wird, ist die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO). IDO katalysiert die Umsetzung von Tryptophan zu Kynurenin, was zu einer Tryptophanverarmung im umgebenden Milieu führt. Dies wirkt sich hemmend auf die Proliferation von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten aus.

ARG1 war auf mRNA-Ebene in allen Tumorzelllinien schwach exprimiert (Abb. 5.8). Im Vergleich dazu war in Monozyten und CD8⁺ T-Zellen eine deutlich höhere Expression zu erkennen.

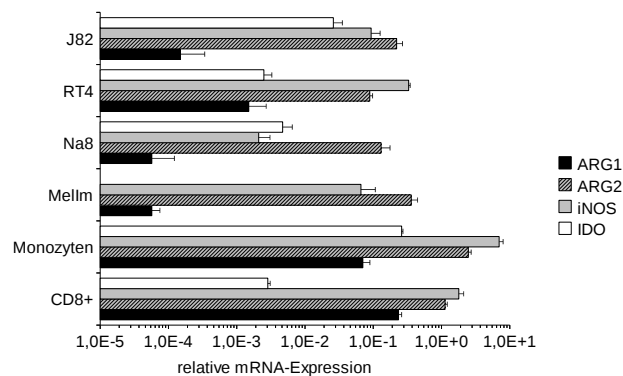


Abbildung 5.8: **mRNA-Expression verschiedener Enzyme des Arginin- und Tryptophanstoffwechsels in humanen Tumorzelllinien und Immunzellen.** Die Expression der Arginasen 1 und 2 (ARG1, ARG2), der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) sowie der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) wurde in verschiedenen humanen Tumorzelllinien (J82/RT4: Urothelkarzinom-Zelllinien, Na8/Mellm: Melanom-Zelllinien) und Immunzellen (Monozyten, CD8⁺ T-Zellen) untersucht. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Fehlerbalken beziehen sich auf technische Replikate einer repräsentativen RNA-Präparation aus mindestens drei Experimenten. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert.

Auch ARG2 war in allen Tumorzelllinien vorhanden, in CD8⁺ T-Zellen und besonders Monozyten wieder leicht erhöht (Abb. 5.8). iNOS folgt einem ähnlichen Muster wie ARG2 und war in allen untersuchten Tumorzelllinien auf ähnlichem Niveau exprimiert. In den Immunzellen, besonders in Monozyten, wiederum stärker als in den Tumorzelllinien (Abb. 5.8). IDO wurde bis auf Mellm in allen untersuchten Tumorzelllinien deutlich exprimiert (Abb. 5.8). In den Immunzellen war dieses Gen besonders in Monozyten hoch exprimiert, die CD8⁺ T-Zellen zeigen hier ähnliche Tendenzen wie die Tumorzelllinien.

5.3.6 Untersuchung des Prostaglandinstoffwechsels in humanen Tumorzelllinien

Im Vergleich dazu wurde die Expression der Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX1, COX2) in den Tumorzelllinien und Immunzellen untersucht. In der Literatur wird beschrieben, dass COX1 konstitutiv in allen Zellen exprimiert ist. Dagegen findet man COX2 induzierbar in Immunzellen und konstitutiv überexprimiert in Tumorzellen. Dort führt es bei Überexpression zur verstärkten Freisetzung von Prostaglandinen, insbesondere Prostaglandin E₂, und zu Angiogenese, was dem Tumor eine erhöhte Nährstoffzufuhr ermöglicht.

COX1 war in allen Tumorzelllinien auf mRNA-Ebene exprimiert, in RT4 jedoch nur schwach (Abb. 5.9). Im Vergleich dazu fanden wir eine deutlich erhöhte Expression von COX1 in den Immunzellen, besonders in Monozyten. Auch COX2 war in allen Tumorzelllinien und Immunzellen deutlich exprimiert. Besonders auffallend war die starke Expression von COX1 und COX2 in Monozyten.

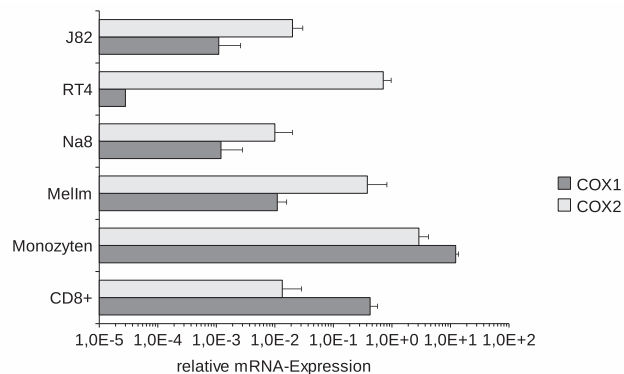


Abbildung 5.9: **mRNA-Expression der Cyclooxygenasen COX1 und COX2 in humanen Tumorzelllinien und Immunzellen.** Die Expression von COX1 und COX2 wurde in verschiedenen humanen Tumorzelllinien (J82/RT4: Urothelkarzinom-Zelllinien, Na8/Mellm: Melanom-Zelllinien) und Immunzellen (Monozyten, CD8⁺ T-Zellen) untersucht. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Fehlerbalken beziehen sich auf technische Replikate einer repräsentativen RNA-Präparation aus mindestens drei Experimenten. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert.

5.3.7 Vergleichende Analyse von Tumorzelllinien und nicht-transformierten Zellen

Im ersten Teil des Projektes konnte die Expression verschiedener Gene, die für den Tumorstoffwechsel von Bedeutung sind, auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. In weiteren Analysen wurde die Expression dieser Gene in Tumorzelllinien mit der Expression in primären Zellen aus Geweben entsprechender Herkunft und Immunzellen verglichen. Hier fokussierten sich unsere Analysen auf Gene des Glukosemetabolismus, da bei den bisherigen Untersuchungen bei Enzymen des Aminosäure- und des Lipidstoffwechsels keine Unterschiede zwischen Normalzellen, Immunzellen und Tumorzellen festgestellt worden waren. Dazu wurde RNA aus Immunzellen bzw. aus primären Zellen gleichen Gewebeursprungs wie die Tumorzelllinien isoliert. Bei den Immunzellen wurden CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen und Monozyten verwendet. Bei den primären Zellen wurden Melanozyten im Vergleich zu den Melanomzelllinien Mclm und Na8, Kolonepithel im Vergleich zur Kolonzelllinie SW620 und Hepatozyten im Vergleich zur Leberkarzinomzelllinie Hep3B analysiert. Die relative Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte per RT-qPCR (Abb. 5.10).

GLUT1 zeigte in den Tumorzelllinien eine deutlich erhöhte Expression im Vergleich zu den primären Zellen entsprechender Gewebe bzw. den Immunzellen (Abb. 5.10a). Die Expression der LDHA folgte einem ähnlichen Muster wie GLUT1 und zeigte sich in den Tumorzelllinien stark erhöht im Vergleich zu primären Zellen (Abb. 5.10b). Die Immunzellen zeigten bezüglich der LDHA-Expression ein ähnliches Muster wie die primären Zellen. Parallel dazu wurde in den Zellkulturüberständen der RNA-Ansätze die Laktatkonzentration bestimmt. Auch hier war in den Tumorzelllinien im Vergleich zu primären Zellen wie auch Immunzellen eine erhöhte Menge an Laktat im Überstand zu finden. Die MCT1-Expression war in den Tumorzelllinien weniger einheitlich, verglichen mit primären Zellen und Immunzellen (Abb. 5.10c/d).

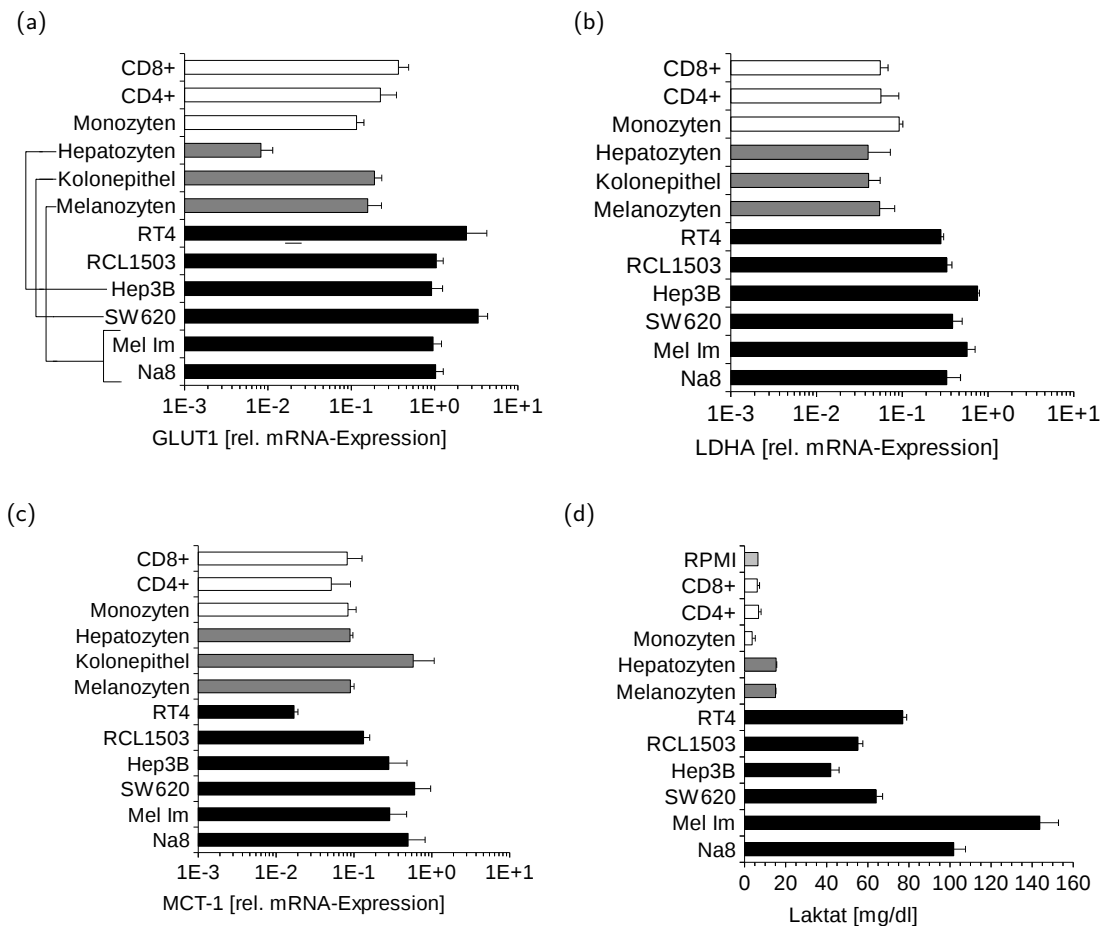


Abbildung 5.10: **Vergleichende Untersuchung der Expression von GLUT1, LDHA und MCT1 sowie der Laktatsekretion in Tumorzelllinien, Immunzellen und entsprechenden Primärzellen.** Per RT-qPCR wurde in verschiedenen Zellen die relative mRNA-Expression von **(a)** GLUT1, **(b)** LDHA und **(c)** MCT1 bestimmt. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert. Fehlerbalken beziehen sich auf RT-qPCR-Analysen von drei unabhängigen RNA-Präparationen. **(d)** Parallel dazu wurde die Laktatkonzentration in den Überständen der Ansätze anhand eines enzymatischen Tests spektrophotometrisch gemessen. Fehlerbalken beziehen sich auf drei unabhängige Ansätze.

□ Immunzellen: CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, Monozyten
 ■ primäre Zellen: Melanozyten, Kolonepithelzellen, Hepatozyten
 ■ ausgewählte Tumorzelllinien: Na8/MelIm=Melanom-Zelllinien, SW620=Kolonkarzinom-Zelllinie, Hep3B=Leberkarzinom-Zelllinie, RCL1503=Nierenkarzinom-Zelllinie, RT4=Urothelkarzinom-Zelllinie

5.3.8 Analyse des Warburg-Effekts und des Glukosemetabolismus in Biopsien und Schnitten

Da Zelllinien nur ein Modellsystem für primäre Tumore darstellen, wurden auch Tumorbiopsien und Gefrierschnitte analysiert. Dazu wurden Biopsien bzw. Gefrierschnitte aus dem Urothelkarzinom, dem hepatozellulären Karzinom (HCC) und dem Nierenzellkarzinom (RCC) untersucht. Das Tumorgewebe wurde mit Normalgewebe verglichen, dass aus der umgebenden Region der Tu-

morbiopsien stammt und von einem Pathologen eindeutig als Normalgewebe identifiziert wurde. Somit konnte für jeden Tumor auch das entsprechende Normalgewebe desselben Patienten zum Vergleich herangezogen werden. Es wurde RNA aus den Biopsien bzw. Gefrierschnitten isoliert und in einer RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde per RT-qPCR die relative mRNA-Expression der analysierten Gene bestimmt. Da bei der Analyse der Tumorzelllinien die größten Expressionsunterschiede zwischen Tumorzellen und primären Zellen bzw. Immunzellen im Glukosemetabolismus zu finden waren, fokussierten sich unsere weiteren Expressionsstudien an den Biopsien auf den Glukosemetabolismus.

5.3.8.1 RT-qPCR Glukosemetabolismus-assoziiierter Gene im Urothelkarzinom

Zur Analyse Glukosemetabolismus-assoziiierter Gene im Urothelkarzinom wurde RNA aus Gefrierschnitten isoliert und per RT-PCR in cDNA umgeschrieben. Die relative Quantifizierung erfolgte per RT-qPCR. Das untersuchte Tumormaterial gruppierte sich in Normalgewebe und Tumore unterschiedlicher Invasivität. Dazu gehörten papilläre (pTa), leicht invasive (pT1) und stark invasive (pT2) Tumore.

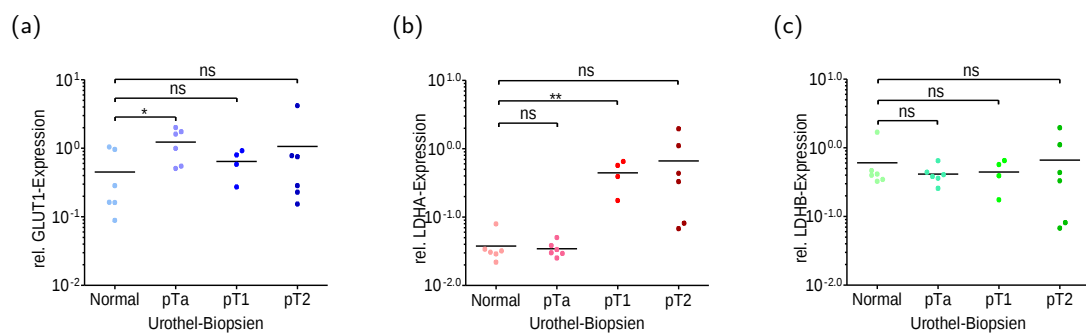


Abbildung 5.11: mRNA-Expression Glukosemetabolismus-assoziiierter Gene im Urothelkarzinom. Per RT-qPCR wurde die mRNA-Expression des Glukosetransporters GLUT1 (a) und der Laktatdehydrogenasen A (b) und B (c) in Urothel-Biopsien analysiert. Es wurden Biopsien von Normalgewebe im Vergleich zu papillären (pTa), leicht invasiven (pT1) und stark invasiven (pT2) Tumoren untersucht (Student's t-Test, $p < 0,0323$ *, $p < 0,0012$ **). RNA wurde aus Gefrierschnitten isoliert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression der einzelnen Proben mittels RT-qPCR bestimmt, die horizontalen Linien entsprechen den Mittelwerten einer Gruppe. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert.

Eine signifikant höhere GLUT1-Expression konnte zwischen papillären Tumoren (pTa) und Normalgewebe festgestellt werden (Abb. 5.11a). Dagegen war die LDHA, verglichen mit Normalgewebe, bei leicht invasiven Tumoren (pT1) signifikant erhöht und in stark invasiven Tumoren (pT2) ebenfalls tendentiell erhöht (Abb. 5.11b). Die Expression von LDHB zeigte, im Vergleich zu Normalgewebe, bei keinem Tumortyp signifikant unterschiedliche Expressionslevel (Abb. 5.11c).

5.3.8.2 RT-qPCR Glukosemetabolismus-assoziiierter Gene im HCC

Parallel wurden mit dem Glukosemetabolismus assoziierte Gene im hepatozellulären Karzinom untersucht. Für diese Analysen war aus Biopsien isolierte RNA vorhanden und wurde in einer RT-PCR zu cDNA umgeschrieben. Die relative mRNA-Quantifizierung erfolgte wieder anhand von RT-qPCR (Abb. 5.12).

Die GLUT1-Expression war im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe tendentiell, jedoch statistisch nicht signifikant erhöht. Die Expression von LDHA und LDHB zeigte keine signifikanten Unterschiede, wobei bereits die basale Expression im Normalgewebe sehr hoch war.

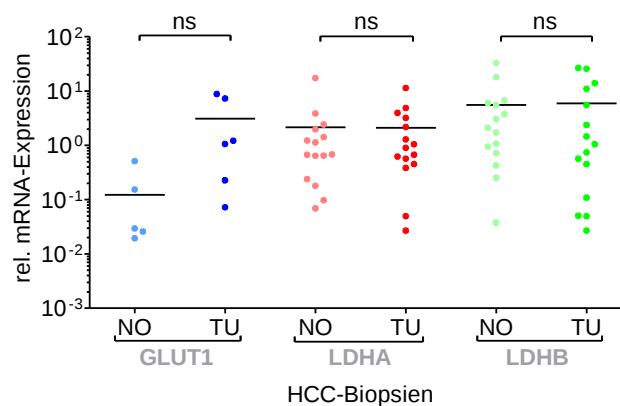


Abbildung 5.12: **mRNA-Expression Glukosemetabolismus-assoziiierter Gene im HCC.** Per RT-qPCR wurde die mRNA-Expression von GLUT1, LDHA und LDHB in HCC-Biopsien analysiert. Es wurden Biopsien von Tumorgewebe (TU) im Vergleich zu Normalgewebe (NO) untersucht. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression der einzelnen Proben mittels RT-qPCR bestimmt, die horizontalen Linien entsprechen den Mittelwerten einer Gruppe. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert. Signifikanzen zwischen den Gruppen wurden mit dem Student's t-Test berechnet.

5.3.8.3 RT-qPCR Glukosemetabolismus-assoziiierter Gene im RCC

Das Nierenzellkarzinom (RCC) stellt einen hoch immunogenen Tumor dar, von dem es 4 verschiedene Subtypen gibt (chromophobes RCC, papilläres RCC, klarzelliges RCC und benignes Onco-cytom). Im klarzelligen Typ des Nierenzellkarzinoms liegt häufig eine Mutation im von Hippel-Lindau-Gen (*VHL*) vor. Unter normalen Bedingungen spielt VHL eine Rolle beim Abbau von HIF-1 α . Eine Mutation im *VHL*-Gen führt zur konstitutiven Aktivität von HIF-1 α . Da HIF-1 α als Transkriptionsfaktor Gene wie GLUT1, LDHA oder VEGF reguliert, war eine Veränderung in der Expression dieser Gene zu erwarten. Diese Hypothese konnten wir bei der Analyse der RCC-Biopsien bestätigen (Abb. 5.13).

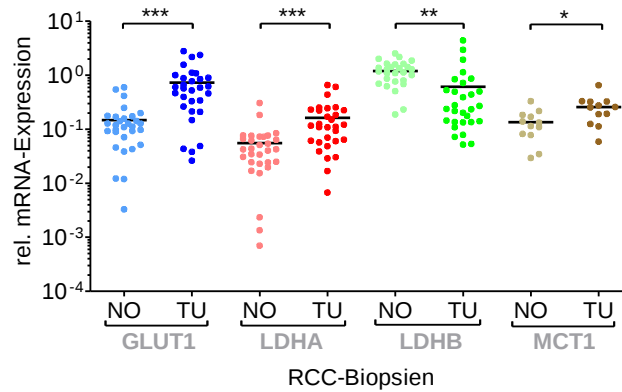


Abbildung 5.13: **mRNA-Expression Glukosemetabolismus-assoziierter Gene im RCC.** Per RT-qPCR wurde die mRNA-Expression von GLUT1, LDHA, LDHB und MCT1 in RCC-Biopsien analysiert. Es wurden Biopsien von Tumorgewebe (TU) im Vergleich zu Normalgewebe (NO) untersucht. RNA wurde aus Gewebebiopsien isoliert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression der einzelnen Proben mittels RT-qPCR bestimmt, die horizontalen Linien entsprechen den Mittelwerten einer Gruppe. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert. (Student's t-Test, $p < 0,0001$ ***, $p < 0,0009$ ***, $p < 0,0083$ **, $p < 0,0232$ *)

Es wurde Tumorgewebe mit Normalgewebe aus den entsprechenden Patienten verglichen. Auch hier wurde RNA aus 30 Gewebebiopsien isoliert und in einer RT-PCR zu cDNA umgeschrieben. Die relative Quantifizierung auf mRNA-Ebene erfolgte wieder durch RT-qPCR.

Die GLUT1-Expression im Tumorgewebe war signifikant erhöht. Auch LDHA zeigte, ähnlich dem Expressionsmuster von GLUT1, einen hoch signifikanten Unterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe auf mRNA-Ebene. Die LDHB-Expression verhielt sich invers zu der von GLUT1 und LDHA. Hier war eine signifikante Erniedrigung im Tumorgewebe zu finden. Bei der Analyse von MCT1 konnte wiederum eine gesteigerte Expression im Tumorgewebe gezeigt werden.

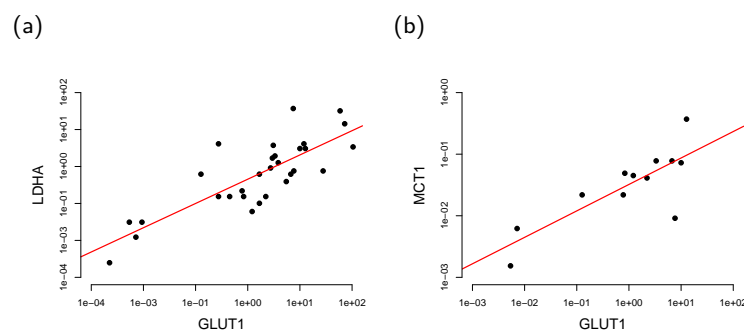


Abbildung 5.14: **Korrelation zwischen GLUT1 und LDHA bzw. GLUT1 und MCT1 mRNA-Expression.** Die RT-qPCR-Analysen der RCC-Biopsien zeigen einen hoch signifikanten Zusammenhang von (a) GLUT1 und LDHA (Student's t-Test, $p < 0,0002$ ***, $R^2=0,67$) sowie (b) GLUT1 und MCT1 (Student's t-Test, $p < 0,0094$ **, $R^2=0,62$). Dargestellt ist die relative mRNA-Expression der Tumorbopsien mit Regressionsgerade. Es wurden nur Tumorbopsien in die Statistik mit einbezogen.

Korrelationsberechnungen zeigten einen hoch signifikanten Zusammenhang zwischen der GLUT1- und LDHA-Expression auf mRNA-Ebene. Auch MCT1 zeigte eine signifikante Korrelation zu GLUT1 (Abb. 5.14a/b).

5.3.8.4 RT-qPCR Aminosäure- und Prostaglandinmetabolismus-assoziiierter Gene im RCC

Neben dem Glukosemetabolismus gibt es noch weitere Stoffwechselwege, die die Immuninfiltration beeinflussen könnten. Deshalb untersuchten wir im RCC zusätzlich Gene, die mit dem Aminosäure- und Prostaglandinmetabolismus assoziiert sind.

Die Expression der ARG1 zeigte keine Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe während ARG2 im Normalgewebe, verglichen mit dem Tumorgewebe, signifikant erhöht war (Abb. 5.15). Auch iNOS war im Normalgewebe tendentiell erhöht, jedoch nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 5.15). IDO1 war im Tumorgewebe signifikant erhöht.

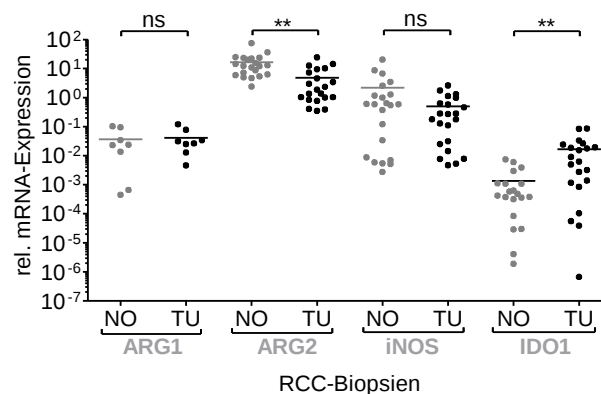


Abbildung 5.15: **mRNA-Expression von Aminosäuremetabolismus-assoziierten Genen im RCC.** Per RT-qPCR wurde die mRNA-Expression von den Aminosäuremetabolismus-assoziierten Genen ARG1, ARG2, iNOS und IDO1 in RCC-Biopsien analysiert. Es wurden Biopsien von Tumorgewebe (TU) im Vergleich zu Normalgewebe untersucht (Student's t-Test, $p < 0,0031$ **). RNA wurde aus Gewebebiopsien isoliert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression der einzelnen Proben mittels RT-qPCR bestimmt, die horizontalen Linien entsprechen den Mittelwerten einer Gruppe. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert. Korrelationen zwischen den Gruppen wurden mit dem Student's t-Test berechnet.

Betrachtet man die Expression der Cyclooxygenasen im RCC waren weder bei COX1 noch bei COX2 signifikante Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe zu finden.

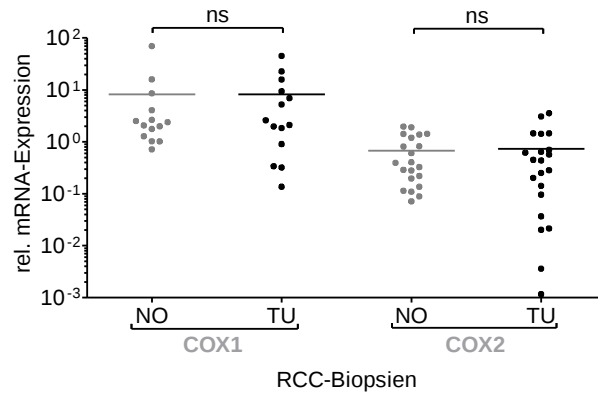


Abbildung 5.16: **mRNA-Expression der Cyclooxygenasen COX1 und COX2 im RCC.** Per RT-qPCR wurde die mRNA-Expression von COX1 und COX2 in RCC-Biopsien analysiert. Es wurden Biopsien von Tumorgewebe (TU) im Vergleich zu Normalgewebe untersucht (Student's t-Test, $p < 0,0080^{**}$). RNA wurde aus Gewebebiopsien isoliert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression der einzelnen Proben mittels RT-qPCR bestimmt, die horizontalen Linien entsprechen den Mittelwerten einer Gruppe. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert. Korrelationen zwischen den Gruppen wurden mit dem Student's t-Test berechnet.

5.3.8.5 RT-qPCR myeloider Immunzellmarker-Gene und T-Zellmarker-Gene im RCC

Der veränderte Glukosemetabolismus und die dadurch auftretende Akkumulation von Laktat könnte das Immuninfiltrat im Tumor verändern. Aus diesem Grund wurden die RCC-Biopsien auch auf die Expression von Immunzellmarker-Genen untersucht (Abb. 5.17).

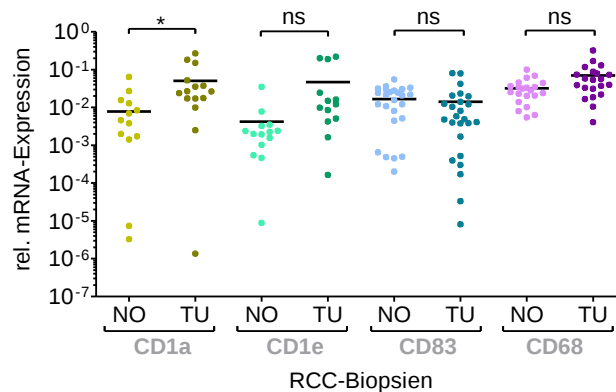


Abbildung 5.17: **mRNA-Expression von myeloiden Immunzellmarker-Genen im RCC.** Per RT-qPCR wurde die mRNA-Expression von den myeloiden Immunzellmarker-Genen *CD1a*, *CD1e*, *CD83* und *CD68* in RCC-Biopsien analysiert. Es wurden Biopsien von Tumorgewebe (TU) im Vergleich zu Normalgewebe untersucht (Student's t-Test, $p < 0,0206^{*}$). RNA wurde aus Gewebebiopsien isoliert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression der einzelnen Proben mittels RT-qPCR bestimmt, die horizontalen Linien entsprechen den Mittelwerten einer Gruppe. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert. Korrelationen zwischen den Gruppen wurden mit dem Student's t-Test berechnet.

CD1a und CD1e sind Marker für unreife, dendritische Zellen während CD83 ein Marker für reife, dendritische Zellen ist. CD68 wird in der Literatur als Makrophagen-Marker beschrieben.

Die Analyse von CD1a ergab eine signifikant erhöhte Expression im Tumorgewebe. CD1e, CD83 sowie CD68 zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe.

Bei den Untersuchungen zur Expression von myeloiden Immunzellmarkern konnten wir zeigen, dass der vielfach in der Immunhistochemie eingesetzte Makrophagenmarker CD68 auch in manchen Tumorzellen exprimiert ist [41]. Wie erwartet, war CD68 auf mRNA-Ebene in Monozyten und Makrophagen sowie in der myeloiden THP-1 Zelllinie sehr stark exprimiert. Neben Lymphozyten, Fibroblasten und Endothelzellen fanden wir den Marker auch in verschiedenen Tumorzelllinien, hier jedoch unterschiedlich stark exprimiert (ohne Abb.).

Neben den myeloiden Markern wurden auch Marker für unterschiedliche T-Zell-Subpopulationen untersucht. CD3 ist ein Marker, den alle T-Zellen exprimieren, während CD4 T-Helferzellen und CD8 zytotoxische T-Zellen charakterisieren. FOXP3 ist ein Marker für regulatorische T-Zellen.

Bei Auswertung der T-Zellmarker-Gene konnte eine signifikant gesteigerte Expression von CD4 im Tumorgewebe nachgewiesen werden (Abb. 5.18). CD3, CD8 und FOXP3 waren im Tumor- und Normalgewebe nicht signifikant unterschiedlich exprimiert, allerdings zeigte sich bei CD8 tendenziell eine erniedrigte Expression im Tumor. Somit konnte die erwartete, verminderte Immuninfiltration, durch die untersuchten Antigene, zumindest auf mRNA-Ebene nicht nachgewiesen werden.

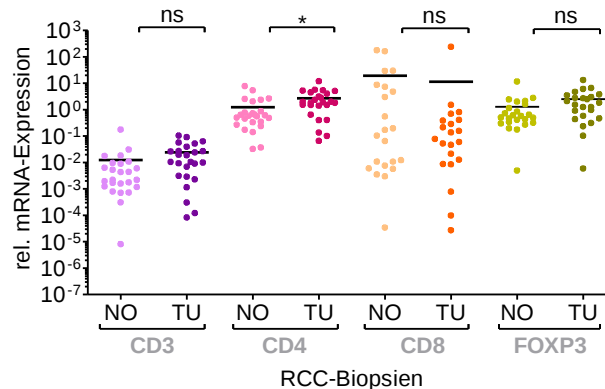


Abbildung 5.18: **mRNA-Expression von T-Zellmarker-Genen im RCC.** Per RT-qPCR wurde die mRNA-Expression der T-Zellmarker-Gene *CD3*, *CD4*, *CD8* und *FOXP3* in RCC-Biopsien analysiert. Es wurden Biopsien von Tumorgewebe (TU) im Vergleich zu Normalgewebe (NO) untersucht (Student's t-Test, $p < 0,0264$ *). RNA wurde aus Gewebebiopsien isoliert. Dargestellt ist die relative mRNA-Expression der einzelnen Proben, die horizontalen Linien entsprechen den Mittelwerten einer Gruppe. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert.

Da die mRNA-Expression *in vivo* nicht immer mit der Proteinexpression vergleichbar ist (z.B. aufgrund von postrationalen Modifikationen), wurden vergleichende Analysen auch auf Protein-

Ebene durchgeführt. In Zusammenarbeit mit Katrin Singer (AG Mackensen, Medizinische Klinik 5, Universitätsklinikum Erlangen) wurden 249 Proben von RCC-Patienten mittels „Tissuemicroarray“ auf GLUT1 und Immunzellmarker untersucht [108]. Dabei fanden wir eine inverse Korrelation zwischen GLUT1-Expression und Infiltration von CD8⁺ T-Zellen (Abb. 5.19).

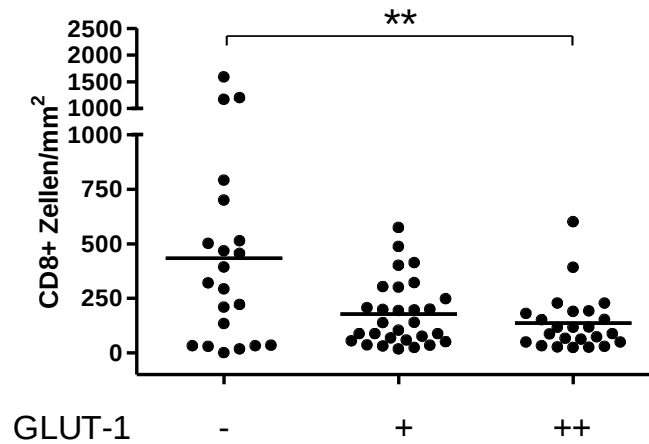


Abbildung 5.19: **Inverse Korrelation zwischen GLUT1-Expression und der Anzahl CD8⁺ T-Zellen im klarzelligen Nierenzellkarzinom in „Tissuemicroarrays“.** In Tissuemicroarrays wurde die Expression von membranösem GLUT1 bestimmt. Die Quantifizierung von GLUT1 erfolgte anhand eines Punktesystems, das Menge und Intensität der GLUT1-Proteinexpression berücksichtigte. Tumor-infiltrierende CD8⁺ T-Zellen wurden pro mm² bestimmt. Die Expression von GLUT1 zeigte eine signifikante, inverse Korrelation zur Infiltration von CD8⁺ T-Zellen (Student's t-Test, $p < 0,0030$ **).

Zusammenfassend wurden verschiedene Gene des Stoffwechsels auf mRNA-Ebene analysiert. Die größten Unterschiede zwischen Tumorzellen und primären Zellen zeigten sich hierbei im Glukosestoffwechsel. Dieser Unterschied konnte beim Vergleich zwischen RCC- und Normalgewebe bestätigt werden. Der gesteigerte Glukosestoffwechsel in den Tumorbiopsien konnte teilweise für das Urothelkarzinom und für das HCC bestätigt werden, was Unterschiede in den verschiedenen Tumortypen widerspiegelt.

5.4 Pharmakologische Modulation des Glukosestoffwechsels

Die bisherigen Experimente zeigen, dass in vielen Tumoren ein veränderter Glukosemetabolismus vorliegt und bestätigen damit die Warburg-Hypothese. Dies stellt ein potentielles Ziel für die Tumorthherapie dar. In weiteren Experimenten wurde daher die pharmakologische Modulation des Glukosestoffwechsels untersucht.

5.4.1 Modulation der Laktatproduktion durch Glykolyseinhibitoren und deren Auswirkung auf die Proliferation bei humanen Melanomzelllinien

Verschiedene Glykolyseinhibitoren sind bekannt. Oxamsäure ist ein LDH-Inhibitor, der die Produktion von Laktat in der Zelle unterdrückt. Der Glykolyseinhibitor 2-Deoxy-D-Glukose weist am 2. C-Atom einen Austausch einer Hydroxylgruppe durch ein H-Atom auf. Dadurch kann es nach Aufnahme in die Zelle und Umsetzung zu 2-Deoxy-D-Glukose-6-Phosphat nicht weiter verstoffwechselt werden. α -Cyano-4-Hydroxymizsäure inhibiert Monocarboxylattransporter, die für die Ausschleusung des Laktats aus der Zelle verantwortlich sind [110].

Alle Substanzen führen bereits bei niedrigen, eingesetzten Konzentrationen zu einer verringerten Laktatsekretion (Abb. 5.20a/b/c). Die Proliferation wurde auch bei allen Substanzen signifikant vermindert, allerdings erst bei höheren Konzentrationen (Abb. 5.20d/e/f). Dies deutet darauf hin, dass die Proliferationsinhibition ein indirekter Effekt der verringerten Glykolyse sein könnte.

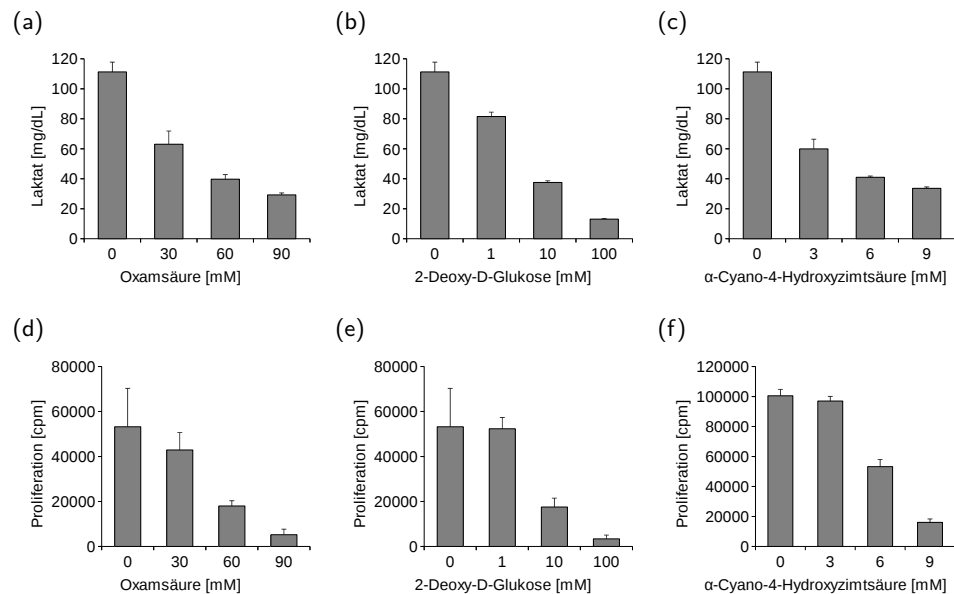


Abbildung 5.20: **Inhibition der Laktatsekretion und Proliferation durch Glykolyseinhibitoren.** Es wurde der Einfluss von Oxamsäure, 2-Deoxy-D-Glukose und α -Cyano-4-Hydroxymizsäure auf die Proliferation und Laktatsekretion von Melm untersucht. Die Zellen wurden 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der entsprechenden Reagenzien inkubiert. **(a,b,c)** Anschließend wurden Überstände zur Laktatmessung abgenommen. **(d,e,f)** Nach dem gleichen Prinzip angesetzte Zellen wurden 2 h nach dem Aussäen mit ^3H -Thymidin zur Proliferationsmessung markiert. Nach 24 h Inkubation wurde die Proliferationsrate (cpm) anhand des ^3H -Thymidin-Einbaus an einem Beta-Plate-Counter bestimmt. Fehlerbalken beziehen sich auf technische Replikate (n=5).

5.4.2 Effekt der Kombination von 2-Deoxy-D-Glukose mit Dexamethason auf die Proliferation von humanen Leukämiezellen

Das Glukokortikoid Dexamethason (DEX) induziert in Lymphozyten Apoptose und ist heute ein gängiges Medikament in der Therapie von akuten lymphoblastischen Leukämien [49].

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Peter Oefner (Institut für funktionelle Genomik, Universität Regensburg) untersuchten wir die Effekte niedriger Dosen des Glykolyseinhibitors 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG) in Kombination mit dem Apoptoseinduktor DEX auf akute lymphoblastische Leukämiezellen. Hierbei wurden die akute lymphatische Leukämie (T-ALL) - T-Zelllinie CEM-CCRF C7H2 und die B-ALL Zelllinie 697/EU-3 mit 3 mM 2-DG und 100 nM DEX inkubiert. Anschließend wurde aus den Zellen RNA isoliert und per RT-qPCR die mRNA-Expression der Glukosetransporter GLUT1, GLUT3 und GLUT14 untersucht (Abb. 5.21).

Die Zelllinie CEM-CCRF C7H2 zeigte bereits nach drei Stunden eine Herunterregulation von GLUT1 auf mRNA-Ebene um 50% gegenüber Kontrollen, die nur mit 100 nM DEX behandelt wurden während in 697/EU-3 nur eine sehr geringe Reduktion gegenüber den Kontrollen, zu beobachten war. GLUT3 und GLUT14 wurden in beiden Zelllinien nicht reguliert [32].

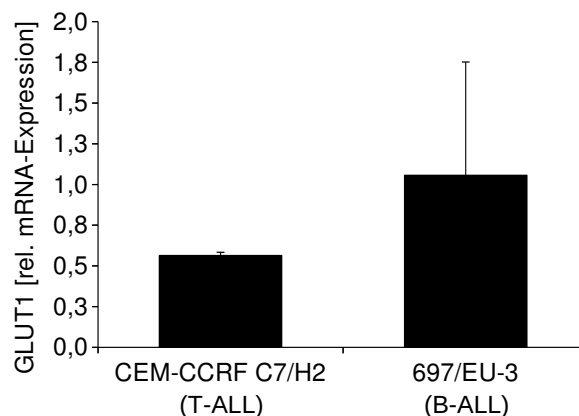


Abbildung 5.21: **GLUT1 mRNA-Expression in ALL Zelllinien nach Behandlung mit Dexamethason und 2-Deoxy-D-Glukose.** Die Zelllinien CEM-CCRF C7H7 (T-ALL) und 697/EU-3 (B-ALL) wurden für 3 h mit 100 nM Dexamethason (DEX) und 3 mM 2-Deoxy-D-Glukose (2-DG) behandelt. Anschließend wurde RNA isoliert und die relative mRNA-Expression von GLUT1 mittels RT-qPCR bestimmt. Werte entsprechen dem Quotienten aus Behandlung mit DEX+2-DG zu Kontrollen (nur DEX, kein 2-DG). Fehlerbalken beziehen sich auf RT-qPCR-Analysen von mindestens drei unabhängigen RNA-Präparationen. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert.

5.5 Genetische Modulation des Glukosestoffwechsels

Unser Ziel ist es die Effekte einer verringerten Laktatsekretion von Tumoren auf das Immunsystem *in vivo* zu untersuchen. In so einem System könnte die pharmakologische Modulation der Laktatdehydrogenase A (LDHA) auch Immun- oder Stromazellen beeinflussen. Um auch *in vivo* eine selektive Verringerung der Laktatsekretion ausschließlic in den Tumorzellen zu erreichen entschieden wir uns dafür die LDHA auf genetischer Ebene stabil zu supprimieren. Dies wurde sowohl für die humane Zelllinie Mellm als auch für die murine Zelllinie B16.SIY E12 durchgeführt. Beide Zelllinien wurden mit je 4 verschiedenen Plasmiden transfiziert, von denen jedes eine unterschiedliche shLDHA-Sequenz enthielt, um ein Plasmid mit maximaler Effizienz zur Herunterregulation der LDHA zu finden. Um durch das Plasmid hervorgerufene Effekte auf die Laktatproduktion der Zelllinien auszuschließen, wurden diese zusätzlich mit einem Kontrollplasmid transfiziert, das an Stelle der shLDHA-Sequenz eine sog. „scrambled“-Sequenz enthielt. Diese „scrambled“-Sequenz besteht aus einer *in silico*-konstruierten Basenzusammensetzung, die an keiner bekannten mRNA-Sequenz bindet. Zusätzlich beinhalteten diese Konstrukte einen GFP-Marker, mit dessen Hilfe die Tumorzellen nach der Transfektion zur Klonierung in 96-Well-Platten gesortet werden konnten.

Bei den ersten Transfektionsexperimenten stellten wir fest, dass die GFP-Fluoreszenz shLDHA-positiver Klone mit zunehmenden Passagen schwächer wurde, was vermutlich auf ein Abschalten des GFP-Promotors im Vektor zurückzuführen ist. Eine zusätzliche Kotransfektion mit einem pGene/V5-His-Plasmid, bei dem das Zeozin-Resistenzgen durch ein Blastizidin-Resistenzgen ausgetauscht wurde, ermöglichte in folgenden Experimenten eine zusätzliche Antibiotikaselektion positiver Klone nach der Transfektion.

5.5.1 Stabile Herunterregulation der Laktatdehydrogenase A auf mRNA- und Protein-Ebene - Effekte auf die Laktatproduktion in der humanen Melanomzelllinie Mellm

Die humane Zelllinie Mellm wurde nach der Transfektion für eine Dauer von 3 Wochen mittels Antibiotika selektioniert. Dazu wurde Blastizidin in einer Konzentration von 4 µg/ml verwendet. Anschließend wurden die positiven Klone per Zellsorter über den fluoreszenten GFP-Marker in 96-Well-Platten gesortet (1 Zelle/Well) und über mehrere Wochen aus den Einzelzellen angezogen. Von diesen Zellklonen wurden RNA-Präparationen angefertigt, die zu einer ersten Kontrolle der Herunterregulation der LDHA auf mRNA-Ebene per RT-qPCR analysiert wurden. Abb. 5.22 zeigt die Selektion von Mellm-Klonen auf die Herunterregulation der LDHA auf mRNA-Ebene.

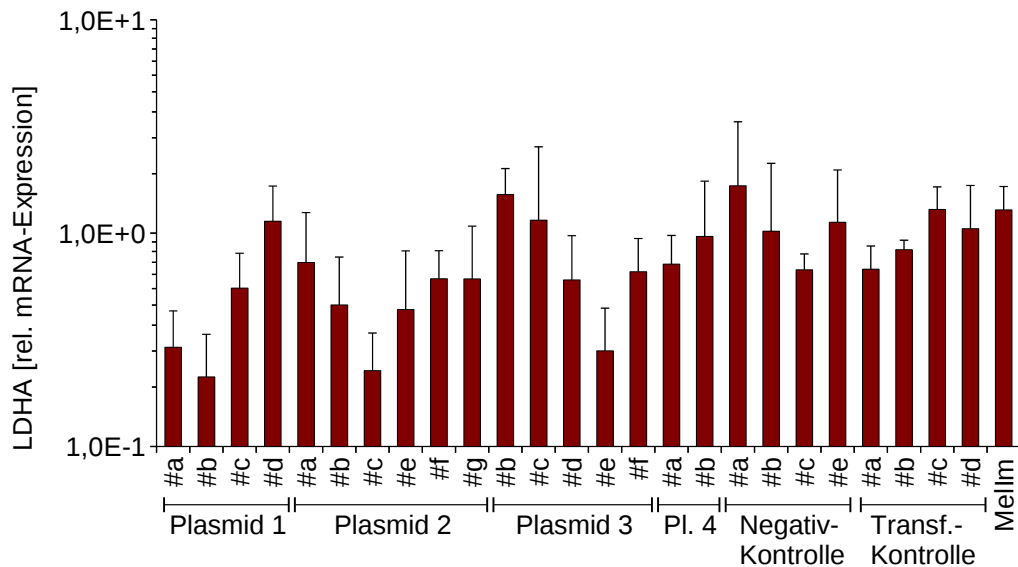


Abbildung 5.22: **Expression der LDHA in shLDHA-transfizierten Melm-Klonen.** In Melm-Klonen wurde die Expression der LDHA auf mRNA-Ebene bestimmt, um Klone mit verminderter LDHA-Expression zu finden. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Fehlerbalken beziehen sich auf RT-qPCR-Analysen von 3 unabhängigen RNA-Präparationen. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert.

- Plasmid 1-4: 4 Plasmide mit unterschiedlichen shLDHA-Sequenzen
- Negativ-Kontrolle: Konstrukt mit „scrambled“-Sequenz
- Transfektions-Kontrolle: Melm Zellen, nur mit Transfektionsreagenz behandelt
- Mel Im: untransfizierte Zelllinie

Die transfizierten Klone zeigten ein sehr heterogenes Expressionsmuster der LDHA. Besonders bei den Klonen #1a, #1b, #2c, #3e fand man eine starke Suppression der LDHA-Expression. Die Negativkontrollen und Transfektionskontrollen variierten nicht so stark und exprimierten die LDHA auf vergleichbarem Level wie die untransfizierten Zellen.

Aus diesem Screening wurden mehrere Klone, in denen die LDHA herunterreguliert war, ausgewählt und weiter untersucht. Eine erneute RNA-Präparation bestätigte die verminderte Expression der LDHA auf mRNA-Ebene gegenüber den Kontrollen und der untransfizierten Zelllinie. Parallel dazu wurden Proteinlysate dieser Klone im Western-Blot untersucht. Die verminderte LDHA-Expression bestätigte sich auch hier auf Protein-Ebene in den entsprechenden Klonen (Abb. 5.23c). Parallel zu LDHA wurde LDHB untersucht. LDHB war auf mRNA- sowie auf Protein-Ebene in allen Klonen vorhanden und wenig reguliert (Abb. 5.23d).

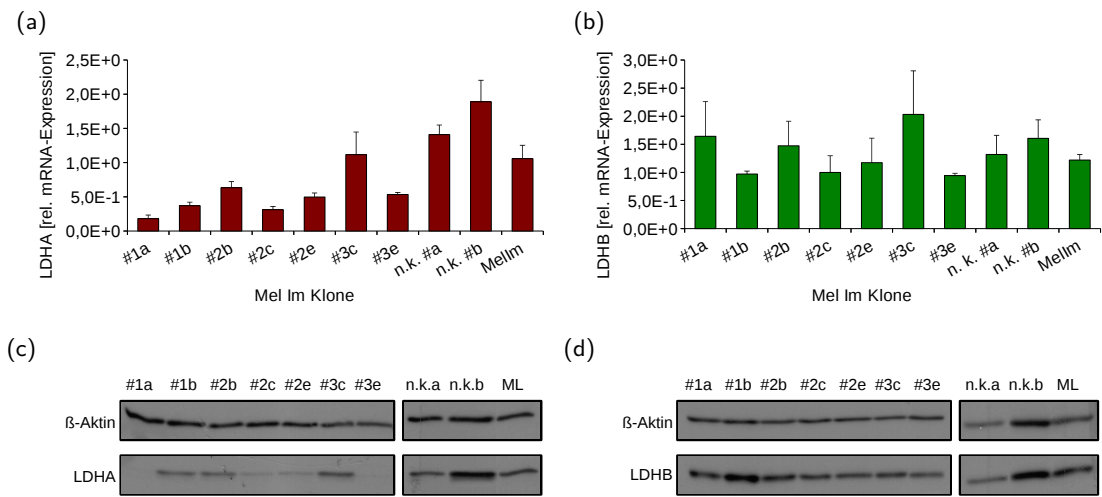


Abbildung 5.23: **Regulation der LDHA und LDHB auf mRNA- und Protein-Ebene in ausgewählten Mellm-Klonen.** In ausgewählten Mellm-Klonen wurde die Expression der (a) LDHA und (b) LDHB auf mRNA-Ebene untersucht. Parallel dazu wurden Western-Blots gegen (c) LDHA und (d) LDHB durchgeführt. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Fehlerbalken beziehen sich auf technische Replikate einer RNA-Präparationen. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert. Western-Blots wurden nach einer Proteinbestimmung mit gleichen Mengen an Protein geladen, zur Kontrolle wurde gegen β -Aktin gefärbt.

- #1-#4: 4 Plasmide mit unterschiedlichen shLDHA-Sequenzen
- n.k.: Negativkontrolle (Konstrukt mit „scrambled“-Sequenz)
- Mellm/ML: untransfizierte Zelllinie/Monolayer

Ergänzend hierzu wurde in Zellkulturüberständen die Laktatkonzentration bestimmt (ohne Abb.). Trotz großer Unterschiede auf mRNA- und Protein-Ebene waren die maximalen Unterschiede in der Laktatsekretion geringer. Klone mit der niedrigsten Laktatsekretion waren #2c, #3c und #3e, bei den Negativkontrollen zeigte besonders #b eine hohe Laktatkonzentrationen im Überstand. Für weitere Analysen und Vergleiche wurden der Klon #3e und die Negativkontrolle n.k. #b verwendet, da sich hier die größten Unterschiede auf mRNA- und Protein-Ebene sowie bei der Laktatsekretion zeigten.

Durch erneutes Sortieren auf GFP-positive Zellen wurden die Mellm-Klone #3e und n.k. #b weiter subkloniert. Laktatmessungen in Zellkulturüberständen mehrerer Passagen zeigten, dass sich der Unterschied zwischen dem Subklon #3e/c und der Negativkontrolle n.k. #b/a verringerte, je länger die Subklone kultiviert wurden, wobei wir die Subklone ohne Antibiotika hielten, um abzuklären wie lange diese ohne Selektionsdruck stabil bleiben (Abb. 5.24). Dies ist Voraussetzung um mit diesen Subklonen mehrwöchige Experimente in der Maus durchführen zu können. Dabei variierte die Laktatsekretion im Kontrollsubklon n.k. #b/a stärker als im Subklon #3e/c. Hier stieg die Laktatsekretion erst nach einer Kulturdauer von ca. 3 Monaten moderat an. Die weiteren Analysen wurden auf die Mausmelanomzelllinie B16.SIY E12 fokussiert.

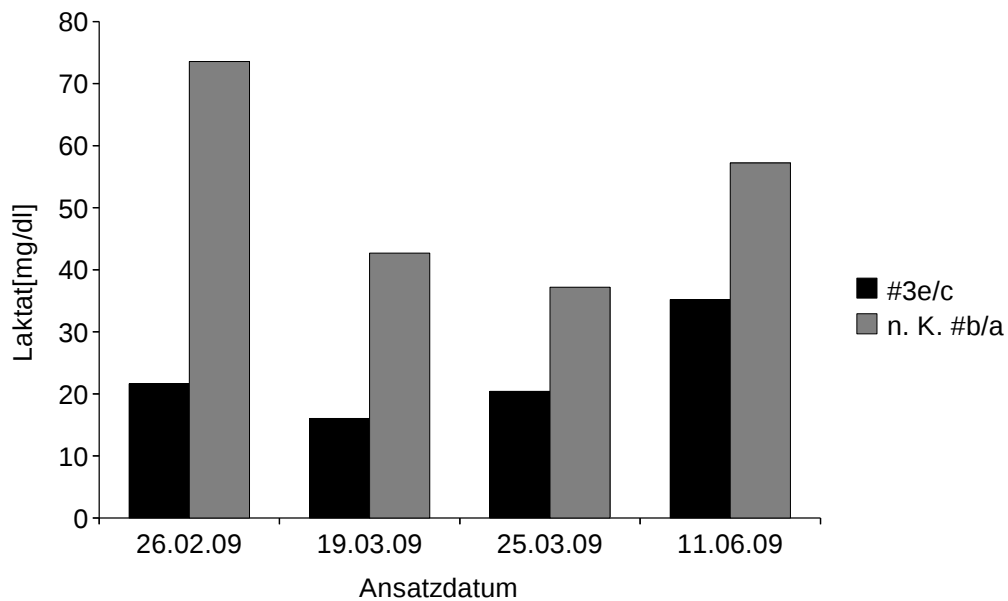


Abbildung 5.24: **Laktatsekretionsverhalten der Mellm Subklone über mehrere Passagen hinweg.** Von den ausgewählten Mellm Subklonen #3e/c und n.k. #b/a wurde über mehrere Passagen hinweg die Laktatsekretion im Überstand bestimmt und verglichen. Die Subklone wurden in einer Konzentration von 25000 Zellen/Well in 96-Well Platten fünffach ausgesät. Nach weiteren 24 h wurde in den abgenommenen Überständen die Laktatkonzentration an einem AVIDA 1650 spektrophotometrisch gemessen. Fünffache Ansätze desselben Subklons wurden gepoolt, um genügend Volumen für die Messung zu erhalten.

5.5.2 Stabile Herunterregulation der Laktatdehydrogenase A auf mRNA-Ebene und Protein-Ebene - Effekte auf die Laktatproduktion in der murinen Melanomzelllinie B16.SIY E12

Bei der Selektion der B16.SIY E12-Klone mit niedriger LDHA-Expression wurde nach dem gleichen Verfahren vorgegangen wie bei den humanen Klonen. Auch hier wurden mehrere Klone gefunden, deren Herunterregulation der LDHA auf mRNA- sowie auf Protein-Ebene bestätigt werden konnte (Abb. 5.25).

Die Klone #2a, #2k und #2l zeigten die niedrigste mRNA-Expression gegenüber den Negativkontrollen bzw. der untransfizierten Zelllinie. Neben der LDHA war auch die LDHB in allen Klonen und Negativkontrollen auf mRNA- wie auf Protein-Ebene exprimiert.

Zusätzlich wurde die Laktatkonzentration im Überstand bestimmt. Eine verringerte Laktatkonzentration war am deutlichsten bei Klon #2l zu beobachten, im Vergleich zu den Negativkontrollen n.k. #a und n.k. #b bzw. zu B16.SIY E12, lag ein Unterschied von ca. 50% vor. Die Negativkontrollen n.k. #a und n.k. #b entsprechen in der Laktatsekretion den untransfizierten B16.SIY E12 (ohne Abb.).

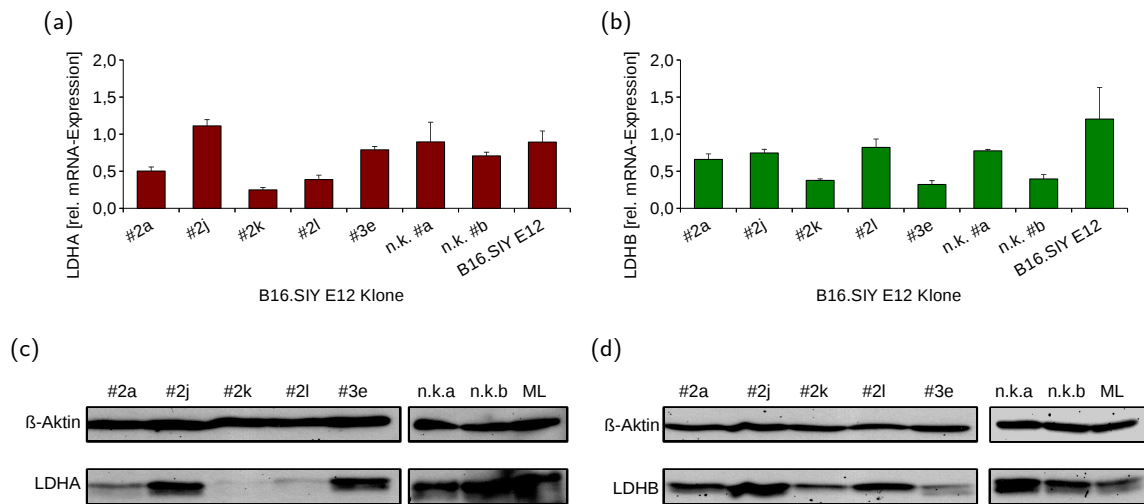


Abbildung 5.25: **Regulation der LDHA und LDHB auf mRNA- und Protein-Ebene in ausgewählten B16.SIY E12-Klonen.** In ausgewählten B16.SIY E12-Klonen wurde die Expression der (a) LDHA und (b) LDHB auf mRNA-Ebene untersucht. Parallel dazu wurden Western-Blots gegen (c) LDHA und (d) LDHB durchgeführt. Die relative mRNA-Expression wurde mittels RT-qPCR bestimmt. Fehlerbalken beziehen sich auf technische Replikate einer RNA-Präparationen. Alle gemessenen Expressionslevel wurden auf die Expression von 18S rRNA normalisiert. Western-Blots wurden nach einer Proteinbestimmung mit gleichen Mengen an Protein geladen, zur Kontrolle wurde gegen β -Aktin gefärbt.

- #1-#4: 4 Plasmide mit unterschiedlichen shLDHA-Sequenzen
- n.k.: Negativkontrolle (Konstrukt mit „scrambled“-Sequenz)
- B16.SIY E12/ML: untransfizierte Zelllinie/Monolayer

5.5.3 Proliferation der genetisch veränderten, murinen B16.SIY E12-Zellen

Wie in Abb. 5.20 gezeigt, inhibierten die Glykolyseinhibitoren Oxamsäure, 2-Deoxy-D-Glukose bzw. α -Cyano-4-Hydroxymizsäure konzentrationsabhängig die Proliferation von Mellm und B16.SIY E12. Nun wurde untersucht, ob die Hemmung der LDHA auf genetischer Ebene auch einen Effekt auf die Proliferation hat. Die zuvor untersuchten B16.SIY E12-Klone zeigten ähnliche Proliferationsraten, vergleichbar mit der untransfizierten Zelllinie B16.SIY E12 (Abb. 5.26).

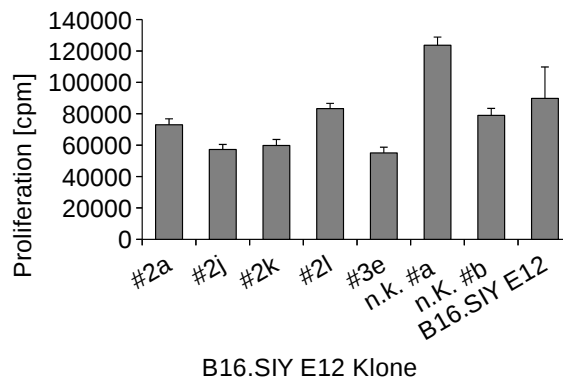


Abbildung 5.26: **Bestimmung der Proliferationsrate von B16.SIY E12-Klonen.** Von B16.SIY E12-Klonen, die mit einem shLDHA-Plasmid stabil transfiziert wurden, wurde die Proliferationsrate bestimmt. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 25000 Zellen/Well in 96-Well Platten angesetzt und zur Proliferationsmessung mit ^3H -Thymidin gelabelt. Nach weiteren 24 h Inkubation wurde die Proliferationsrate (cpm) anhand des ^3H -Thymidin-Einbaus an einem Beta-Plate-Counter bestimmt. Fehlerbalken beziehen sich auf technische Replikate eines Ansatzes (n=5).

- #1-#4: 4 Plasmide mit unterschiedlichen shLDHA-Sequenzen
- n.k.: Negativkontrolle (Konstrukt mit „scrambled“-Sequenz)
- B16.SIY E12: untransfizierte Zelllinie

5.6 Wachstum der genetisch veränderten Klone *in vivo*

Unsere Arbeitshypothese war, dass die starke Laktatsekretion von Tumorzellen die Immunabwehr gegenüber Tumorzellen inhibiert. Daher wurden Klone ausgewählt, die in die Maus gespritzt werden sollten, um das Tumorstadium *in vivo* zu beobachten.

5.6.1 Laktatsekretion und Proliferationsverhalten von murinen Subklonen *in vitro*

Nach einer erneuten Sortierung wurden der wenig Laktat sezernierende Subklon #2l/c und der normale Laktatmengen sezernierende Kontrollsubklon n.k. #a/c für die Versuche im Mausmodell ausgewählt und vor der Injektion nochmals auf Laktatsekretion und Proliferationsverhalten getestet. Wie in Abb. 5.27 zu sehen ist, zeigte der Klon #2l/c bei fast gleicher Proliferationsrate eine um über 70% verringerte Laktatsekretion gegenüber dem Kontrollsubklon n.k. #a/c.

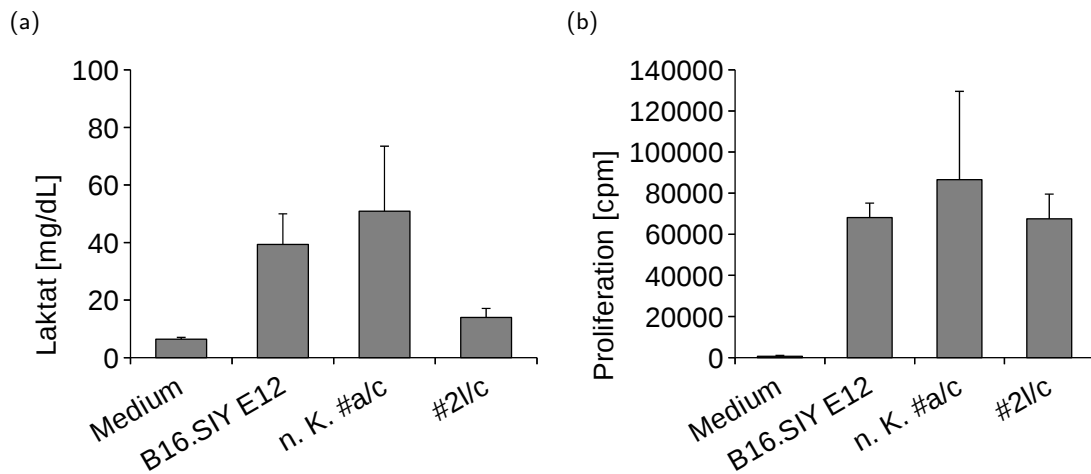


Abbildung 5.27: **Laktatsekretion und Proliferation der B16.SIY E12-Subklone #2l/c und n.k. #a/c.** Die B16.SIY E12 Subklone #2l/c und n.k. #a/c wurden in einer Konzentration von 25000 Zellen/200 μ l per Well (n=5) in 96-Well-Platten ausgesät. Nach 24 h wurde die Laktatsekretion im Überstand und die Proliferationsrate durch 3 H-Thymidin-Einbau bestimmt. Der Subklon #2l/c zeigt im Vergleich zur ursprünglichen Zelllinie B16.SIY E12 und zur Kontrolle n.k. #a/c ein nur leicht unterschiedliches Proliferationsverhalten und eine deutlich verringerte Laktatsekretion. Fehlerbalken beziehen sich auf drei unabhängig durchgeführte Experimente.

Diese Analyse bestätigte eine Herunterregulation der LDHA im Klon #2l/c und keinen deutlichen Einfluss auf das Proliferationsverhalten im Vergleich zu Kontrolle und untransfizierter B16.SIY E12-Zelllinie.

Um deren Wachstumsverhalten *in vivo* zu untersuchen wurden beide Klone nun in verschiedenen Zellzahlen subkutan in immunkompetente C57/BL6-Mäuse und in immundefiziente Rag1^{-/-}-Mäuse injiziert.

5.6.2 Subkutane Injektion von murinen B16.SIY E12-Zellen mit einer verringerten Laktatsekretion in C57/BL6-Mäuse

In Zusammenarbeit mit Dr. Gudrun Köhl (Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Universitätsklinikum Regensburg) wurden in ersten *in vivo*-Versuchen die beiden B16.SIY E12-Subklone mit verschiedenen Zellzahlen von 1×10^4 – 1×10^6 in immunkompetente C57/BL6-Mäuse subkutan injiziert. Wie am Tumolvolumen zu erkennen ist, waren deutliche Unterschiede im Wachstumsverhalten festzustellen (Abb. 5.28). Der Kontrollsubklon n.k. #a/c wuchs deutlich stärker in der Maus als der Subklon #2l/c (Abb. 5.28a-c). Die entstandenen Tumore zeigten dabei keinen Einfluss auf das Mausgewicht während der Versuchsdauer (Abb. 5.28d-f).

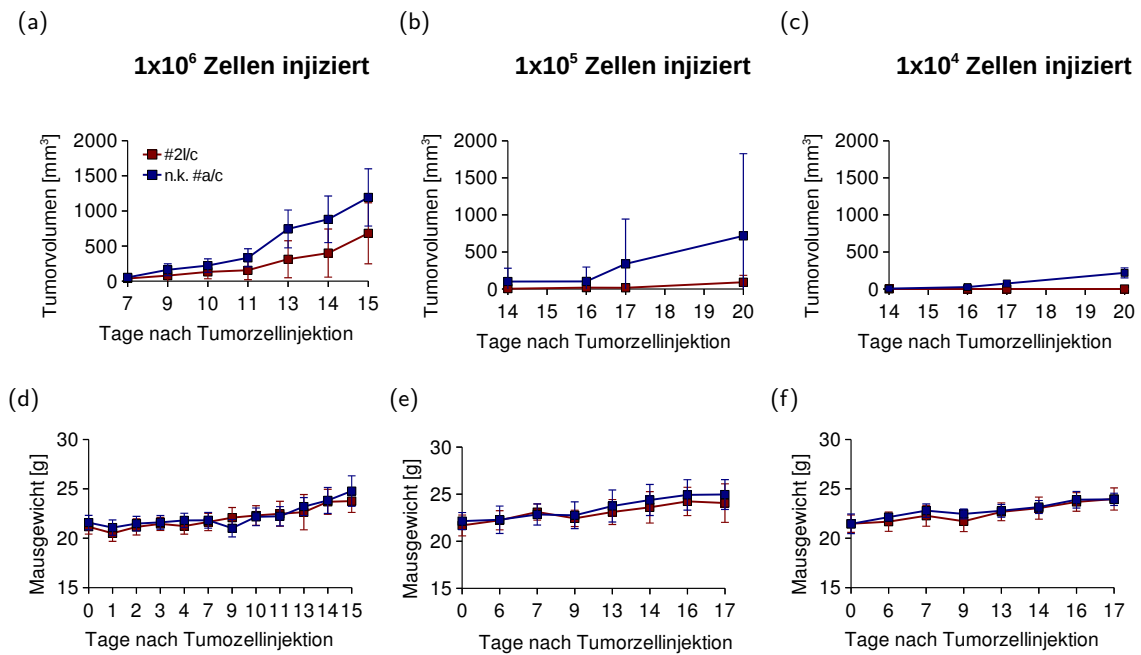


Abbildung 5.28: **Wachstumsverhalten der B16.SIY E12-Subklone #2l/c und n.k. #a/c in C57/BL6-Mäusen.** Die B16.SIY E12-Subklone #2l/c und n.k. #a/c wurden mit Zellzahlen von 1×10^6 bis 1×10^4 in C57/BL6-Mäuse subkutan injiziert. (a,b,c) Das Tumorstadium wurde über einen Zeitraum von 2-3 Wochen in regelmäßigen Abständen bestimmt. (d,e,f) Parallel dazu wurde das Gewicht der Mäuse bestimmt. Fehlerbalken beziehen sich auf $n=4-10$ Mäuse eines Experiments (1×10^6 Zellen: $n=10$ je Subklon, 1×10^5 Zellen: $n=4$ je Subklon, 1×10^4 : $n=5$ je Subklon).

Ein weiteres Ziel war es, eine minimale Zellzahl zu finden, bei der das Immunsystem der Maus ein Anwachsen des Tumors verhindern kann. Tabelle 5.1 zeigt die Tumoranwachsraten der Subklone #2l/c und n.k. #a/c in Abhängigkeit der injizierten Zellzahl.

inj. Zellzahl	n.k. #a/c	#2l/c
1×10^4	3 (5)	0 (4)
1×10^5	4 (4)	1 (4)
1×10^6	10 (10)	10 (10)

Tabelle 5.1: **Tumoranwachsraten in C57/BL6-Mäusen.** n.k. #a/c: normal Laktat sezernierender Kontrollsubklon, #2l/c: wenig Laktat sezernierender Subklon.

Wurden 1×10^6 Zellen injiziert, wuchsen beide Subklone in allen Mäusen an ($n=10$ je Klon). Dagegen wuchs bei einer injizierten Zellzahl von 1×10^4 die Negativkontrolle n.k. #a/c in 3 von 5 injizierten Mäusen an. Subklon #2l/c wuchs in keiner der 4 injizierten Mäuse an.

Weiterhin zeigt der Subklon #2l/c bei einer gespritzten Zellzahl von 1×10^6 während der gesamten Versuchsdauer eine Zunahme des Tumorstadiums (Abb. 5.28a). In niedrigeren injizierten

Zellzahlen zeigte der Subklon ein schwaches Wachstum (Abb. 5.28b/c). Beim Versuch mit 1×10^6 injizierten Zellen waren nach 7 Tagen das erste Mal Tumore sichtbar. Der Versuch musste aufgrund der Tumorgroße nach 15 Tagen beendet werden. Bei den injizierten Zellzahlen von 1×10^5 und 1×10^4 war ein Tumorstadium erst nach 14 Tagen zu erkennen. Der Versuch wurde nach 20 Tagen beendet.

5.6.3 Subkutane Injektion von murinen B16.SIY E12-Zellen mit einer verringerten Laktatsekretion in Rag1^{-/-}-Mäuse

Um zu überprüfen, ob das murine Immunsystem wirklich für das divergente Wachstum der beiden veränderten Zelllinien in der Maus verantwortlich ist, injizierten wir die beiden Subklone mit einer Zellzahl von 1×10^5 in je fünf immundefiziente Rag1^{-/-}-Mäuse. Wir wählten genau diese Zellzahl, da hier bei der Injektion in die immunkompetenten C57/BL6-Mäuse die Negativkontrolle n.k. #a/c in allen vier Mäusen anwuchs während der Subklon #2l/c nur noch in einer von vier Mäusen anwuchs. Dies deutete auf eine sichtbare Modulation des Tumorstadiums durch das Immunsystem der Maus hin. Rag1^{-/-}-Mäusen fehlen reife B- und T-Lymphozyten. Es zeigte sich, dass beide Subklone in der Rag1^{-/-}-Maus über einen Zeitraum von 21 Tagen etwa gleich große Tumore bildeten (Abb. 5.29). Dabei wuchsen beide Klone in allen injizierten Mäusen an. Dies deutet an, dass Lymphozyten entscheidend das Tumorstadium kontrollieren und dass Laktat diese Immunfunktion der Lymphozyten inhibiert. Auch das Mausgewicht wurde von den Tumoren nicht beeinflusst, beide Mausgruppen zeigten ein ähnliches Gewicht.

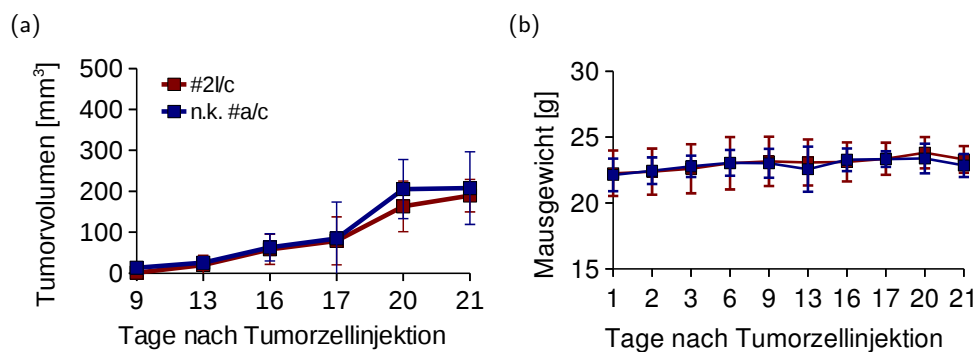


Abbildung 5.29: **Wachstumsverhalten der B16.SIY E12-Subklone #2l/c und n.k. #a/c in Rag1^{-/-}-Mäusen.** Die B16.SIY E12-Subklone #2l/c und n.k. #a/c wurden mit einer Zellzahl von 1×10^5 in Rag1^{-/-}-Mäuse subkutan injiziert. (a) Das Tumorstadium wurde über einen Zeitraum von 3 Wochen in regelmäßigen Abständen bestimmt. (b) Parallel dazu wurde das Gewicht der Mäuse bestimmt. Fehlerbalken beziehen sich auf n=5 Mäuse eines Experiments.

Bisher wurden nur Experimente mit einer geringen Anzahl an Mäusen durchgeführt. Dennoch lassen die bisherigen Ergebnisse auf eine Modulation der Immunantwort durch Laktat schließen. Deshalb soll in weiteren Arbeiten die Immuninfiltration und das Wachstumsverhalten der Tumore im Mausmodell eingehender untersucht werden.

6 Diskussion

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts hat Otto Warburg erkannt, dass viele Tumore Veränderungen im Glukosestoffwechsel aufweisen, was er damals als „aerobe Glykolyse“ bezeichnete [121]. Seitdem haben sich zahlreiche Wissenschaftler der Erforschung des Warburg-Phänotyps gewidmet. Zudem wurden auch andere Stoffwechselwege entdeckt, die im Tumor fehlreguliert sind und Metaboliten produzieren, die das Immunsystem modulieren können. In der aktuellen Fachliteratur findet man weitgehend Untersuchungen einzelner Stoffwechselwege, fokussiert auf einen oder wenige Tumortypen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein metabolisches Profil verschiedener dysregulierter Stoffwechselwege in humanen Zelllinien und Biopsien unterschiedlicher Tumortypen erstellt. Hiermit in Zusammenhang sollte der Effekt analysierter Tumormetaboliten auf das Immunsystem *in vitro* sowie *in vivo* untersucht werden.

6.1 Metabolische Charakterisierung von humanen Tumorzelllinien und primärem Tumormaterial

6.1.1 Glukosemetabolismus und Atmung in Tumorzelllinien, untransformierten Zellen entsprechender Gewebe und Immunzellen

Es ist bekannt, dass Tumore durch eine hohe Glukoseaufnahme charakterisiert sind und oft eine hohe glykolytische Aktivität zeigen. Diese Eigenschaft wird bereits in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zur Tumordiagnostik genutzt [96]. Glukose wird über die Glukosetransporter (GLUTs) in die Zelle aufgenommen, die z.B. durch Onkogene wie *KRAS*/*BRAF* erhöht exprimiert werden [30].

Im Rahmen der metabolischen Charakterisierung zeigten alle Tumorzelllinien eine starke Expression der Glukosetransporter GLUT1, GLUT3 und GLUT14 auf mRNA-Ebene. Dies deutet auf eine gesteigerte Glukoseaufnahme stark proliferierender Tumore hin. GLUT1 war in verschiedenen Immunzellen, wie T-Zellen und Monozyten, deutlich niedriger exprimiert als in Tumorzelllinien.

Außerdem zeigten primäre Hepatozyten gegenüber hepatozellulären Karzinomzelllinien, sowie Melanozyten gegenüber Melanomzelllinien eine deutlich geringere GLUT1-Expression. Dies lässt auf eine erhöhte Glukoseaufnahme der Tumorzelllinien gegenüber den untransformierten Zellen korrespondierender Gewebe und Immunzellen schließen. Eine erhöhte GLUT1-Expression wurde bereits in vielen Tumoren beschrieben. Vor kurzem konnte erst durch Eichhoff et al. bei der Untersuchung von Melanombiopsien bestätigt werden, dass eine erhöhte GLUT1-Expression im Tumor mit Invasivität und Proliferation korreliert [33]. Im kolorektalen Adenokarzinom konnten Koukourakis et al. auf immunhistochemischer Ebene eine erhöhte Expression von GLUT1 zeigen [61]. Kunkel et al. analysierten immunhistologisch Tumorbiopsien von Patienten, bei denen zuvor ein orales Plattenepithelkarzinom per PET diagnostiziert wurde [65]. Auch sie konnten eine hohe GLUT1-Expression in den Tumorbiopsien finden, die mit einer schlechten Überlebensrate korrelierte.

Da hoch glykolytische Tumore die aufgenommene Glukose primär zu Laktat verstoffwechseln, untersuchten wir die mRNA-Expression der Laktatdehydrogenasen A und B (LDHA, LDHB). Die LDHA katalysiert überwiegend die Umsetzung von Pyruvat zu Laktat und war in allen Zelllinien stark exprimiert. Somit kann angenommen werden, dass die untersuchten Zelllinien stark von der aeroben Glykolyse abhängig sind. Beim Vergleich von Tumorzelllinien mit den Immunzellen und primären Zellen war, wie schon bei GLUT1, die LDHA-Expression in den Tumorzelllinien, verglichen mit untransformierten Zellen und Immunzellen, erhöht. Die gesteigerte mRNA-Expression der LDHA korrelierte mit einer verstärkten Laktatsekretion. Die Laktatkonzentration in Zellkulturüberständen der Tumorzelllinien war deutlich erhöht gegenüber den untransformierten Zellen und Immunzellen. Erhöhte LDH-Spiegel konnten Koukourakis et al. auch *in vivo* im Serum von Patienten mit Brust- und Ovarialkarzinomen messen [64]. Dazu fanden Walenta et al. bei quantitativen Biolumineszenzmessungen erhöhte Laktatspiegel in malignen Tumoren des Zervixkarzinoms, Kolonkarzinoms sowie Tumoren an Kopf und Hals, jedoch nicht in umliegendem Normalgewebe [119, 120]. Koukourakis et al. konnten im Lungenkarzinom und im kolorektalen Adenokarzinom eine erhöhte Expression der LDHA immunhistochemisch zeigen, die mit erhöhter Aggressivität und Invasivität der Tumore korrelierte [62, 63].

Aber auch die LDHB, verantwortlich für die Rückreaktion von Laktat zu Pyruvat, war in allen Tumorzelllinien exprimiert. Dies kann damit erklärt werden, dass die LDH-5, bestehend aus 4 LDHA-Untereinheiten, die vorherrschende, aber nicht alleinige Form im Tumor ist. Auch LDH-1 bis LDH-4, die sowohl LDHA- als auch LDHB-Untereinheiten in unterschiedlicher Zusammensetzung enthalten (Tab. 1.1), können in den Tumorzelllinien exprimiert sein. Darüber hinaus ist es möglich, dass ein Teil der Tumorzellen eines heterogenen Tumors Laktat aufnimmt und

dies in einer Rückreaktion zu Pyruvat verstoffwechselt. Das erzeugte Pyruvat könnte in die Mitochondrien geschleust werden und im Zitratzyklus als Vorstufe zur Makromolekülsynthese dienen. Sonveaux et al. beschrieben im Mausmodell an Lungenkarzinomen und Xenotransplantaten des kolorektalen Adenokarzinoms solche oxidativen Tumorzellen [110]. Sie konnten zeigen, dass diese durch Blockade der Laktattransporter mit α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure auf Glykolyse umstellten und somit therapeutisch angreifbar sind. Wurden die Mäuse unter Glukosemangel gehalten, zeigten sie ein verringertes Tumorwachstum. Außerdem reagierten die Tumore sensibler gegenüber Bestrahlung.

Monocarboxylattransporter sind für den Transport von Laktat aus der Zelle verantwortlich [43] und wurden in allen untersuchten Tumorzelllinien exprimiert. Beim Vergleich mit den Immunzellen und untransformierten Zellen korrespondierender Gewebe zeigte der Monocarboxylattransporter MCT1 geringere Expressionsunterschiede.

Um zu testen, inwieweit die starke Glykolyse der untersuchten Tumorzellen mit einer geringeren Atmung korreliert, analysierten wir den Sauerstoffverbrauch und die Ansäuerung der Tumorzelllinien Mclm, PC3 und LNCap. Die Untersuchung zeigte, dass Mclm und PC3 deutliche Atmungsaktivität aufwiesen. Zusätzlich war jedoch auch eine Ansäuerung des Kulturmediums festzustellen. Im Gegensatz dazu zeigte LNCap nur sehr geringen Sauerstoffverbrauch sowie nur schwache Ansäuerung des Mediums. Grundsätzlich zeigt dies, dass Tumorzellen sowohl oxidativ als auch glykolytisch aktiv sind und unterschiedliche Zelllinien unter gleichen Umweltbedingungen unterschiedliche Aktivität aufweisen.

Deshalb analysierten wir zusätzlich in den Tumorzelllinien die Expression der Pyruvatdehydrogenase (PDH). Die PDH katalysiert die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und reguliert damit den Eintritt von Pyruvat in den Zitratzyklus. Wir fanden die PDH in allen analysierten Tumorzelllinien auf mRNA-Ebene exprimiert. Auch die Malatdehydrogenase (MDH), verantwortlich für die Umsetzung von Oxalacetat zu Malat, wurde untersucht und war in den Zelllinien exprimiert.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Mitochondrien, im Gegensatz zu Warburgs Hypothese, in Tumorzellen durchaus aktiv sind. Laut Vander Heidens et al. Reinterpretation des Warburgeffekts erfüllen die Mitochondrien in der Tumorzelle mit dem Zitratzyklus dabei eine anaplerotische Funktion [45]. Diese Hypothese wird von DeBerardinis et al. unterstützt, der in Glioblastomzellen einen vollständig aktiven Zitratzyklus sowie einen erhöhten Glutaminmetabolismus zeigen konnte [25]. Allerdings zeigen die Ergebnisse auch eindeutig, dass Warburg mit seiner Hypothese bezüglich des erhöhten Glukosestoffwechsels Recht hatte.

6.1.2 Untersuchung des Aminosäure- und Lipidstoffwechsels

Bei der Untersuchung weiterer Stoffwechselwege, die im Tumor verändert sein könnten, fokussierten sich unsere Analysen auf den Aminosäure- und Lipidmetabolismus, da diese Stoffwechselwege potentiell Einfluss auf die Immunantwort haben. Eine erhöhte Expression der Enzyme Arginase (ARG), Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) und induzierbare NO-Synthase (iNOS) führt zur Verarmung von Arginin und Tryptophan im Tumormilieu und zu einer Inhibition der T-Zellen, da diese Aminosäuren absolut essentiell für T-Zellen sind. Die entstehenden Metaboliten Ornithin, Kynurenin und NO wirken dazu inhibitorisch auf T-Zellen [97, 87]. Ornithin und Kynurenin sind Vorstufen des Polyaminstoffwechsels, der in Tumoren häufig erhöht ist. Dadurch scheiden Tumorpatienten häufig erhöhte Mengen an Polyaminen aus. Hier bieten sich Ansätze für die Diagnostik von Tumorerkrankungen [79].

Die Analyse der Arginasen 1 und 2 ergab, dass alle untersuchten Tumorzelllinien eine deutlich geringere mRNA-Expression dieser beiden Enzyme als Immunzellen aufwiesen. Dies deutet darauf hin, dass im Tumor eher Immunzellen das Arginin depletieren. Entsprechend zeigen Untersuchungen in der Maus, dass myeloide Suppressorzellen im Tumor ARG1 exprimieren [94].

iNOS verstoffwechselt wie Arginase Arginin und war ebenfalls in Monozyten stark exprimiert. In der Maus ist beschrieben, dass Makrophagen iNOS exprimieren. Dagegen gibt es widersprüchliche Publikationen in humanen monozytären Zellen. Siedlar et al. kokultivierten humane Monozyten mit Kolonkarzinomzellen und konnten auf mRNA- sowie auf Proteinebene eine iNOS-Expression nachweisen, die eindeutig auf die Monozyten zurückzuführen war [107]. Die Tumorzelllinien alleine produzierten kein iNOS, die Monozyten nur, wenn diese in Kontakt mit den Tumorzelllinien waren. In Kokultur-Experimenten unserer Arbeitsgruppe stimulierten im Gegensatz dazu Monozyten die humane Tumorzelllinie RT4 zur Produktion von iNOS [58]. Bei Kokulturen von humanen Monozyten mit Tumorzellen konnten Szaflarska et al. CD14⁺/CD16⁺-Monozyten als iNOS-exprimierende Subpopulation identifizieren, die in eine Antitumorantwort involviert ist [114].

Auch bei IDO war in Immunzellen eine starke Expression feststellbar. Durch die Verstoffwechselung von Tryptophan durch Tumorzellen und Tumor-assoziierte, monozytäre Zellen könnte es zu einer Tryptophanverarmung im Tumormilieu kommen, die die T-Zellantwort hemmt, wie auch Bradacher et al. im Kolonkarzinom zeigen konnten [10]. Darüber hinaus konnten Chung et al. zeigen, dass die Expression von IDO durch dendritische Zellen die Expansion von regulatorischen T-Zellen fördert [18]. Riesenberg et al. fanden bei der Untersuchung von Biopsien des Nierenzellkarzinoms, dass IDO fast ausschließlich von Endothelzellen in der Tumorregion exprimiert wurde [93]. Da dies mit einer guten Prognose korrelierte, könnten die Endothelzellen damit die

Tryptophanversorgung des Tumors blockieren.

Bei der Analyse des Lipidstoffwechsels wählten wir die Cyclooxygenasen COX1 und COX2. Während COX1 physiologisch in allen Geweben konstitutiv exprimiert ist, findet man die COX2 induzierbar bei Entzündungen und im Tumor [122]. Auch hier waren beide Enzyme tendentiell stärker in Immunzellen als in Tumorzellen exprimiert. Becker et al. konnten in malignen Melanomen eine erhöhte COX2-Expression feststellen, die mit Tumorgroße und Überlebensrate korrelierte [7].

Unsere Daten deuten darauf hin, dass der veränderte Aminosäure- und Lipidstoffwechsel bestimmter Tumore u.a. dadurch bedingt sein könnte, dass infiltrierende Immunzellen, wie z.B. Monozyten, bestimmte Enzyme (ARG, IDO, COX) ebenfalls sehr stark exprimieren.

6.1.3 Der Glukosemetabolismus in Tumorbiopsien und Normalgewebe

Tumorzelllinien bieten ein gutes Modell für die Erforschung des Tumormetabolismus. Um jedoch einen Einblick in die tatsächliche Situation im Tumor zu bekommen, untersuchten wir nun Biopsien und Schnitte aus dem Urothelkarzinom, dem hepatozellulären Karzinom und dem Nierenzellkarzinom. Wir interessierten uns hauptsächlich für den Glukosemetabolismus und damit verbundene Enzyme, da sich in den Analysen mit Zelllinien gezeigt hatte, dass gerade hier hoch signifikante Unterschiede zwischen untransformierten Zellen und Tumorzellen zu finden waren. Diese wurden auf mRNA-Expressionsebene per RT-qPCR untersucht. Für die Analysen wurden Tumorbiopsien mit dem entsprechenden Normalgewebe derselben Patienten verglichen.

Im Urothel zeigte sich in papillären Tumoren eine signifikant höhere GLUT1-Expression als im Normalgewebe. Die LDHA war, verglichen mit Normalgewebe, in leicht invasiven Tumoren signifikant erhöht, während die LDHB keine Regulation zeigte.

Die Analyse der hepatozellulären Karzinombiopsien zeigt mit einer erhöhten GLUT1-Expression in den Tumorbiopsien, verglichen mit den korrespondierenden Normalbiopsien, einen ähnlichen Trend wie die Urothelbiopsien. Der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. In Zusammenarbeit mit Amman et al. konnten wir aber bei höherer Probenzahl eine erhöhte GLUT1-Expression auf mRNA-Ebene sowie auf Proteinebene im hepatozellulären Karzinom zeigen [4]. Daskalow et al. fanden bei mRNA- und Proteinexpressionsanalysen humaner, hepatozellulärer Karzinome eine erhöhte GLUT1-Expression in Tumor-assoziierten Endothelzellen, jedoch nicht in neoplastischen Hepatozyten [21]. GLUT2 war in 50% aller untersuchten Karzinome exprimiert, HIF-1 α jedoch nur in 12% aller untersuchten Karzinome.

Im Urothelkarzinom und im hepatozellulären Karzinom gibt es keine weiteren Untersuchungen auf mRNA-Ebene zu diesem Thema. Allerdings zeigen Arbeiten von Koukourakis et al., dass im

Lungenkarzinom [60] und Kolonkarzinom [61] die Tumorprogression mit der Proteinexpression von GLUT1 und LDHA korrelierte. Auf immunhistochemischer Ebene konnten auch Roh et al. eine erhöhte GLUT1-Expression in Biopsien hepatozellulärer Karzinome feststellen [95]. Im Gegensatz dazu konnten sie keine GLUT1-Expression im umliegenden Normalgewebe und Hepatozyten finden. Kunkel et al. untersuchten an Plattenepithelkarzinom-Patienten immunhistochemisch die GLUT1-Expression und in einer Subgruppe davon den Glukosemetabolismus per FDG-PET [65]. Sie konnten einen Zusammenhang zwischen Glukoseaufnahme sowie Glukosemetabolismus und schlechter Prognose zeigen. Dazu fanden Airley et al. im Zervixkarzinom, dass eine erhöhte GLUT1-Expression mit einer gesteigerten Metastasierungsrate korrelierte [1].

Ein weiterer Tumortyp, den wir analysierten, war das Nierenzellkarzinom (RCC). Gerade im Hinblick auf den Glukosemetabolismus schien dieser Tumortyp besonders interessant zu sein. Besonders im klarzelligen RCC ist oft das von Hippel-Lindau-Gen (*VHL*) mutiert was zu einer konstitutiven Expression von HIF-1 α führt [101, 91]. Da dieser Transkriptionsfaktor unter anderem auch GLUT1 und LDHA reguliert [2], könnte hier der gefundene Warburg-Phänotyp begründet sein. In einer größeren Probenanzahl analysierten wir auch hier die wichtigsten Glukosemetabolismus-assoziierten Gene und wichtige Immunzellmarker auf mRNA-Ebene. Es zeigte sich eine hoch signifikante Erhöhung von GLUT1 und LDHA auf mRNA-Ebene in den Tumorbiospien im Vergleich zum Normalgewebe der gleichen Patienten. Auch bei MCT1 war eine gesteigerte Expression im Tumorgewebe zu erkennen. Zudem fanden wir im Tumor eine verminderte Expression der LDHB. Eine hoch signifikante Korrelation zwischen GLUT1 und LDHA sowie zwischen GLUT1 und MCT1 auf mRNA-Ebene deuten eine Verschiebung der Energieproduktion von oxidativer Phosphorylierung zur Glykolyse an. Die erhöhte Expression von GLUT1 und LDHA konnte auf Proteinebene bestätigt werden, für MCT1 existieren bisher keine Proteindaten. Die Analysen auf Proteinebene wurden von Katrin Singer (AG Mackensen, Medizinische Klinik 5, Universitätsklinikum Erlangen) an Tissuemicroarrays (TMAs) durchgeführt. Eine erhöhte Expression von GLUT1 auf Proteinebene konnte auch von Suganuma et al. im Nierenzellkarzinom bestätigt werden [112]. Unwin et al. beobachteten in Proteomanalysen mit 2D-Gelelektrophoresen und Massenspektrometrie eine erhöhte Expression der LDHA, aber auch anderer Glykolyse-assoziiierter Enzyme wie der Aldolase, Pyruvatkinase M2 und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase im Nierenzellkarzinom [115].

Die hohe Expression von LDHA könnte mit einer hohen Laktatsekretion und Anreicherung von Laktat im Tumorgewebe korrelieren. Da in früheren Untersuchungen gezeigt wurde, dass Laktat inhibitorische Effekte auf Immunzellen hat [36, 28, 40], untersuchten wir auch die Infiltration von Immunzellen anhand der Analyse von Immunmarkern. Wir konnten eine signifikant erhöhte

mRNA-Expression von CD1a im Tumorgewebe feststellen. Dies deutet auf eine erhöhte Infiltration des Tumors mit dendritischen Zellen hin. CD83, ein Reifungsmarker für dendritische Zellen, zeigte jedoch keine Expressionsunterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe auf mRNA-Ebene. Die Expression von CD1a und CD83 deutet darauf hin, dass die Reifung dendritischer Zellen im Tumormilieu inhibiert ist.

Zusätzlich wurde die mRNA-Expression von T-Zellmarkern untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikant gesteigerte Expression von CD4 im Tumorgewebe. CD3, CD8 und FOXP3 waren auf mRNA-Ebene zwischen Tumor- und Normalgewebe aber nicht unterschiedlich exprimiert. Jedoch konnte auf Proteinebene in Tissuearray eine verminderte Infiltration CD8⁺ T-Zellen in bestimmten Tumoren gefunden werden, woraus sich eine inverse Korrelation zwischen GLUT1-Expression und Infiltration von CD8⁺ T-Zellen ergab [108].

Diese Daten deuten darauf hin, dass die verstärkte GLUT1- und LDHA-Expression klarzelliger Nierenzellkarzinome die Infiltration CD8⁺ T-Zellen negativ beeinflussen kann. Eine verringerte Glukosekonzentration, hervorgerufen durch die verstärkte Glukoseaufnahme des Tumors, könnte die Effektorfunktion und Infiltration von T-Zellen im Tumormilieu modulieren, da T-Zellen zur Aktivierung und Proliferation erhöhte Mengen an Glukose benötigen [15]. Ein Eingreifen in den Glukosemetabolismus als therapeutisches Ziel könnte hier sowohl die Tumormalignität verringern als auch die T-Zellaktivierung begünstigen. Darüber hinaus könnte eine Verringerung der Laktatsekretion den Tumor sensibler für Chemo- und Immuntherapien machen [129].

Parallel wurde auch der Lipid- und Aminosäuremetabolismus im Nierenzellkarzinom analysiert. Hier zeigte sich auf mRNA-Ebene bei COX1/2 sowie ARG1 und iNOS kein Unterschied zwischen Tumor- und Normalgewebe. Nur bei IDO fanden wir eine signifikante Hochregulation im Tumor und bei ARG2 eine Herunterregulation. In weiteren Analysen muß geklärt werden, inwieweit die erhöhte IDO-Expression ebenfalls mit der Immunzellinfiltration korreliert. In der Literatur gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen IDO-Expression und der Anzahl der regulatorischen T-Zellen im Tumor [105, 70].

Zusammenfassend konnte der Warburg-Phänotyp in den analysierten Biopsien im RCC, jedoch nur teilweise im Urothel- und im hepatozellulären Karzinom bestätigt werden. Allerdings stammten die analysierten Biopsien aus unterschiedlichen Geweben und Tumortypen. Dies könnte bedeuten, dass verschiedene Tumortypen aus unterschiedlichen Geweben auch unterschiedliche Expressionsmuster zeigen.

6.2 Pharmakologische und genetische Modulation des Glukosestoffwechsels

Die vorherigen Experimente zeigten, dass Zelllinien, die hoch LDHA exprimieren, erhöhte Mengen an Laktat sezernieren. Dass eine erhöhte LDHA-Expression mit Metastasierung und schlechter Prognose korreliert, konnte von Walenta et al. im Zervixkarzinom [120] und von Koukourakis et al. im Kolon- und Lungenkarzinom gezeigt werden [63, 60]. Darüber hinaus stellten Koukourakis et al. fest, dass glykolytische Tumorzellen auch Tumor-assoziierte Fibroblasten modulieren. Unsere Arbeitsgruppe konnte *in vitro* zeigen, dass die erhöhte Laktatkonzentration die Aktivierung und Reifung Tumor-assoziiierter dendritischer Zellen [40] und T-Zellen [36] blockiert. Diese Beobachtungen machten den Glukosemetabolismus von Tumoren zu einem interessanten Ziel für die Tumorthherapie. Durch eine gezielte Senkung der Laktatsekretion könnte die Immunsuppression im Tumor eventuell aufgehoben werden. *In vivo* gibt es jedoch keine Untersuchungen dazu, wie die Laktatsekretion des Tumors die Immuninfiltration moduliert.

Um den Zusammenhang zwischen Laktat und Immunsuppression bzw. Tumorproliferation *in vivo* zu beweisen, wurden humane Mellm- und murine B16.SIY E12-Tumorzelllinien mit einer verringerten LDHA-Expression generiert, um diese Effekte *in vivo* in Mausexperimenten zu untersuchen. Parallel dazu wurde die Auswirkung der verminderten Laktatsekretion *in vitro* auf humane Mellm-Tumorzellen mittels pharmakologischer Modulation untersucht.

Auf pharmakologischer Ebene wurden verschiedene Glykolyseinhibitoren, wie Oxamsäure (blockiert LDHA), 2-Deoxy-D-Glukose (blockiert Hexokinase 2) und α -Cyano-4-Hydroxymethylpantothensäure (blockiert MCT1) verwendet. Es zeigte sich bei allen 3 Wirkstoffen eine konzentrationsabhängige Verringerung der Laktatsekretion. Parallel dazu stellten wir auch eine konzentrationsabhängige Proliferationsinhibition in den untersuchten Tumorzelllinien fest, wobei zur Inhibition der Laktatsekretion jeweils niedrigere Konzentrationen des Wirkstoffs nötig waren als zur Inhibition der Proliferation. Dies deutet darauf hin, dass beide Effekte nicht unmittelbar zusammenhängen. Auswirkungen von 2-Deoxy-D-Glukose auf die Proliferation konnten Cay et al. *in vivo* in Lebertumoren von Ratten beobachten [14]. Er injizierte Ratten Kolonkarzinomzellen in die Leber. Über fünf Tage wurde diesen täglich 2-Deoxy-D-Glukose in die Lebervene appliziert. Nach Resektion zeigten die Tumore der so behandelten Tiere im Vergleich zu Kontrollen, die mit Kochsalzlösung behandelt wurden, ein verringertes Wachstum. Die inhibitorischen Eigenschaften von α -Cyano-4-Hydroxymethylpantothensäure auf die Proliferation konnten Jin et al. auch in Lungenkarzinomzelllinien feststellen [51]. Sie zeigten, dass eine Kombination von Interferon- α mit α -Cyano-4-Hydroxymethylpantothensäure

die Proliferation dieser Tumorzelllinien stärker beeinflusste, als eine Inkubation mit einer der beiden Substanzen alleine. Über die Proliferationsinhibition von Tumorzelllinien durch Oxamsäure sind *in vitro* keine Untersuchungen bekannt.

Bonnet et al. zeigten *in vivo* im Rattenmodell, dass das Tumorwachstum durch pharmakologische Inhibition der Glykolyse mit Dichloracetat inhibierbar ist [9]. Ratten, die Tumorzellen subkutan injiziert bekamen, wurde über mehrere Wochen Dichloracetat oral über das Trinkwasser verabreicht. Diese Tiere entwickelten wesentlich kleinere Tumore als Kontrollen, die Wasser ohne Dichloracetat tranken. Die Auswirkung einer supprimierten LDHA-Expression konnten Xie et al. auch an Nierenkarzinomzellen in einem murinen Xenotransplantationsmodell zeigen [126]. Diese Tumorzellen überexprimieren die LDHA aufgrund einer Mutation im Fumarathydrase-Gen, dessen Genprodukt, wie VHL, eine Stabilisation von HIF-1 α bewirkt. Hier führte eine Inhibition der LDHA per shRNA zu einer Wachstumsinhibition der Tumorzellen in Zellkultur sowie in der Maus. Dass eine Reduktion der LDHA-Expression auch durch „small-molecule“-Inhibitoren möglich ist, bewiesen Le et al. [69]. Sie verwendeten 3-Dihydroxy-6-Methyl-7-(Phenylmethyl)-4-Propylnaphthalen-1-Carboxylsäure (FX11). Ein Inhibitor, der selektiv die LDHA, nicht aber die LDHB blockiert, und darüber hinaus eine Umstellung des Energiestoffwechsels auf oxidative Phosphorylierung fördert.

Einen additiven Effekt von Glykolyseinhibitoren mit anderen Medikamenten konnten wir zudem bei akuten lymphoblastischen Leukämiezelllinien feststellen. Diese wurden mit 2-Deoxy-D-Glukose und Dexamethason, einem Glukokortikoid und Medikament gegen Leukämien [49], inkubiert. Dabei zeigte sich bereits nach 3 Stunden eine Herunterregulation des Glukosetransporters GLUT1 um 50%. Kontrollen, die nur mit Dexamethason behandelt wurden, zeigten dabei nur eine sehr geringe Reduktion der mRNA-Expression.

Diese bisherigen Studien analysierten nur die Auswirkungen der inhibierten Glykolyse auf das Tumorwachstum, jedoch nicht die Auswirkungen einer verringerten Laktatsekretion auf die Immuninfiltration des Tumors.

Um die Effekte von Laktat auf Immunzellen *in vivo* zu untersuchen hielten wir eine Modulation der Laktatsekretion auf genetischer Ebene für sinnvoller, weil bei *in vivo*-Versuchen mit Medikamenten ein direkter Effekt auf die Immunzellen oder andere Stromazellen nicht ausgeschlossen werden kann. Dagegen erlaubt die genetische Hemmung eine selektive Suppression der LDHA in Tumorzellen.

Im Rahmen der Arbeit wurde ein shRNA-Konstrukt verwendet, mit dem die Zelllinien per Lipofektion stabil transfiziert wurden. Zusätzlich wurden die Zelllinien mit einem Leervektor transfiziert, der eine sog. „scrambled“-shRNA Sequenz enthielt, um einen Einfluss des Vektors auf unser Sys-

tem zu kontrollieren. Eine Herunterregulation der LDHA wurde bereits mit anderen Technologien durchgeführt. Chen et al. erreichten dies zum ersten Mal in Antikörper-produzierenden Hybridomzelllinien [16]. Eine teilweise Zerstörung des LDHA-Gens durch homologe Rekombination führte hier zur gewünschten Reduktion der Laktatsekretion um 50%. Dazu konnten Jeong et al. eine Reduktion der LDH-Aktivität per antisense-RNA in CHO-Zelllinien (Chinese hamster ovary) um etwa 30% erreichen. In dieser Zelllinie konnten auch Kim et al. mit einem siRNA-Expressionsvektor die Laktatsekretion um bis zu 55% reduzieren [57].

Die von uns verwendete Technologie zeigt eine hohe und dauerhafte Suppression der LDHA in verschiedenen Klonen der transfizierten Zelllinie B16.SIY E12 auf mRNA- und Proteinebene. Einige Klone zeigten eine Suppression der LDHA von bis zu 90%. Zusätzlich bestimmten wir in den korrespondierenden Überständen die Laktatsekretion. Auch hier war in einigen Klonen die Laktatsekretion um bis zu 70% reduziert, was die Effektivität des Systems bestätigt. Negativkontrollen, mit dem Leervektor transfiziert, verhielten sich wie die untransfizierten Zelllinien, was eine Beeinflussung der Laktatsekretion durch den Vektor ausschließt.

Da die LDH-Isoenzyme sehr homologe Sequenzen aufweisen, analysierten wir zusätzlich die Expression der LDHB. Da LDHB die Rückreaktion von aufgenommenem Laktat zu Pyruvat katalysiert, könnte dies weitere Ergebnisse beeinflussen. Die Ergebnisse zeigten keine Regulation weder auf mRNA- noch auf Proteinebene, was eine Beeinflussung der LDHB durch die shRNA-Sequenz ausschließt.

Im Gegensatz zu den transfizierten B16.SIY E12 war bei Mellm die Reduktion der Laktatsekretion über längere Zeit nicht stabil. Wir beobachteten eine zunehmende Verringerung der Laktatsekretionsunterschiede zwischen Klonen und Kontrollen mit zunehmenden Passagen. Grund hierfür könnte eine Heterogenität in Stoffwechsel und Proteinproduktion der Zellen sein, die sich mit der Zeit entwickelt, da einzelne Zellen der Suppression der LDHA „entkommen“ könnten. Dies könnte z.B. durch Abschalten des shRNA-Expressionsvektors infolge einer Methylierung des Promotors eintreten.

Unsere weiteren Analysen wurden daher mit den stabilen B16.SIY E12-Klonen durchgeführt. Von den transfizierten B16.SIY E12 subklonierten wir für die *in vivo* Versuche in der Maus geeignete Klone, die, verglichen mit Negativkontrollen und der untransfizierten Zelllinie, bei relativ gleicher Proliferation möglichst große Unterschiede in der Laktatsekretion zeigten.

6.3 Verhalten genetisch veränderter B16.SIY E12-Klone *in vivo*

Um die immunsuppressiven Eigenschaften von Laktat *in vivo* zu untersuchen, injizierten wir einen B16.SIY E12-Subklon mit verminderter Laktatsekretion und einen stark Laktat sezernierenden Kontrollsubklon subkutan in immunkompetente C57/BL6- sowie in immundefiziente Rag1^{-/-}-Mäuse, denen reife B- und T-Zellen fehlen. Vorgehende Tests hatten gezeigt, dass der wenig Laktat sezernierende Subklon #2l/c und die normale Laktatmengen sezernierende Negativkontrolle n.k. #a/c im Vergleich zur untransfizierten B16.SIY E12-Zelllinie *in vitro* gleich proliferierten. Der Wachstumsverlauf der Tumore wurde *in vivo* über zwei bis drei Wochen beobachtet.

Um eine minimale Zellzahl zu finden, bei der das Immunsystem das Anwachsen des Tumors verhindern kann, injizierten wir den Subklon #2l/c und die Kontrolle n.k. #a/c in verschiedenen Zellzahlen von 1×10^4 bis 1×10^6 in die immunkompetenten C57/BL6 Mäuse. Wie aus Tab. 5.1 ersichtlich ist, wuchsen bei einer injizierten Zellzahl von 1×10^6 sowohl der weniger Laktat produzierende Subklon als auch die Kontrollsubklone in allen Mäusen an. Während bei einer Zellzahl von 1×10^5 die Kontrollsubklone noch in allen Mäusen anwuchsen, konnten wir beim Subklon #2l/c nur in einer von vier Mäusen Tumorstadium erkennen. Im Gegensatz dazu zeigte die Injektion von 1×10^5 Zellen dieser beiden Zelllinien keine Wachstumsunterschiede in den immundefizienten Rag1^{-/-}-Mäusen. Noch deutlicher spiegelte sich dieses Wachstumsverhalten bei Injektion von 1×10^4 Zellen in C57/BL6 wieder. Hier wuchs n.k. #a/c noch in drei von fünf Mäusen an, während #2l/c in keiner von vier Mäusen anwuchs. Besonders die Injektion niedriger Zellzahlen physiologisch gesehen für die *in vivo*-Situation eine größere Relevanz, da Tumore langsam und oft über eine längere Zeit hinweg entstehen. Dass diese Tumorzellen nicht anwachsen, deutet darauf hin, dass das Immunsystem Tumore, die nur geringe Mengen an Laktat produzieren, kontrollieren kann. Dafür spricht auch, dass in der immundefizienten Maus beide Tumorzellsubklone vergleichbar wachsen, denn hier fehlen Immunzellen für die Tumorstadiumskontrolle.

Dies könnte ein Hinweis auf die immunmodulatorischen Eigenschaften von Laktat auf das Immunsystem der Maus sein. Die große Mengen an Laktat sezernierenden Subklone könnten in der immunkompetenten C57/BL6-Maus große Laktatmengen produzieren, wodurch inhibitorische Effekte auf die T-Zellen das Tumorstadium begünstigen [36].

Erhöhte Spiegel an Laktat und LDHA im Tumor wurden von Walenta et al. [120] und Kourakis et al. [60, 61, 64] mehrfach beschrieben und korrelieren mit schlechter Prognose. Dies könnte im Hinblick auf unsere Ergebnisse darauf hindeuten, dass durch hohe Laktatmengen lokal eine Immunsuppression induziert wird. Ergänzend deuten unsere Analysen darauf hin, dass die Ursache für die schlechte Prognose hoch LDHA exprimierender Tumore in einer Beeinflussung der

Immuninfiltration bzw. der Aktivierung von Immunzellen begründet sein könnte. Weiterführende immunhistochemische und durchflusszytometrische Analysen könnten zur Klärung dieser Fragestellungen beitragen und bei der Entwicklung von Therapien, die auf den Glukosemetabolismus abzielen, helfen.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Dysregulationen in Stoffwechselwegen, wie z.B. dem Glukosemetabolismus, die eine Anreicherung von Metaboliten wie Laktat im Tumormilieu verursachen, sind typisch für Tumore. Unsere Arbeitsgruppe konnte mehrfach zeigen, dass Laktat die Reifung und Funktion von Immunzellen moduliert. Erstes Ziel dieser Arbeit war es, ein metabolisches Profil dysregulierter Stoffwechselwege in Tumorzelllinien im Vergleich zu Normalzellen auf genetischer Ebene zu erstellen. Dazu sollten die entsprechenden Metaboliten in Zellkulturüberständen nachgewiesen werden. Hierzu wurden mehrere Tumorzelllinien unterschiedlicher Herkunft mit RT-qPCR auf die mRNA-Expression entsprechender Gene untersucht. Es zeigte sich, dass Tumorzelllinien keine starken Veränderungen im Lipidstoffwechsel (COX1 und COX2) gegenüber Immunzellen zeigten. Interessanterweise war aber COX2 insbesondere in primären Monozyten stark exprimiert. Da COX2 laut Literatur im Tumor häufig überexprimiert ist, könnte dies darauf hindeuten, dass nicht Tumorzellen selbst, sondern infiltrierende Immunzellen für die Überexpression mitverantwortlich sind. Ähnliches zeigte sich bei Expression wichtiger Enzyme des Aminosäurestoffwechsels, der IDO1, der iNOS sowie der ARG2. Weiterhin wurden verschiedene Enzyme, des Glukosestoffwechsels analysiert. Hier waren LDHA sowie GLUT1 verstärkt in den Tumorzelllinien exprimiert. Zudem fanden wir eine gegenüber Normalzellen gesteigerte Laktatsekretion von Tumorzellen. Dem gegenübergestellt wurden mit Hilfe der PreSens-Technologie Sauerstoffverbrauch und pH-Änderungen des Kulturmediums im Zeitverlauf bestimmt und wir fanden, dass die analysierten Tumorzellen eine deutliche Atmungsaktivität aufwiesen. Auch auf mRNA-Ebene konnte die Expression der PDH sowie der MDH eine mitochondriale Aktivität der untersuchten Tumorzelllinien bestätigen. Dies deutet darauf hin, dass in Tumoren eine hohe Glykolyserate nicht unbedingt mit einer niedrigen Respiration korreliert ist.

Da Tumorzelllinien nur ein Modellsystem für primäre Tumore darstellen, wurde im Anschluss daran das metabolische Profil verschiedener primärer Tumore analysiert. Hierbei wurden Biopsien unterschiedlicher Tumortypen verwendet und mit dem entsprechenden Normalgewebe derselben Patienten verglichen. Im Fall des Nierenzellkarzinoms bestätigten sich die Zellkulturanalysen und wir konnten zeigen, dass LDHA, GLUT1 und MCT1 im Tumorgewebe auf mRNA- und Protei-

nebene überexprimiert ist. Hier konnten wir auch eine Korrelation zwischen einer hohen GLUT1-Expression und einer schwachen Infiltration von CD8⁺ T-Zellen nachweisen [108]. LDHB war dagegen im Tumorgewebe erniedrigt. Im Urothel- und hepatozellulären Karzinom waren GLUT1 und LDHA tendenziell erhöht. Dies deutet darauf hin, dass der Warburg-Phänotyp nur bei bestimmten Tumoren stark ausgeprägt ist. Auch die IDO1 war im Nierenzellkarzinom überexprimiert, nicht aber COX1/2 sowie ARG1 oder iNOS.

Die Abhängigkeit des Tumorwachstums von einer gesteigerten Glykolyse wurde anschließend *in vitro* untersucht. In Mellm und B16.SIY E12 wurde die Glykolyse und die Expression der LDHA sowohl pharmakologisch als auch genetisch supprimiert. Es zeigte sich, dass die pharmakologische Suppression der Glykolyse mittels 2-DG deutlich das Tumorwachstum *in vitro* inhibiert. Hierzu wurde der synergistische Effekt von 2-DG mit Dexamethason untersucht [32]. Zusätzlich wurde die Expression der LDHA mittels shRNA-Konstrukt in Mellm und B16.SIY E12 stabil herunterreguliert. Dies hatte *in vitro* keinen Effekt auf das Tumorwachstum. Im Vergleich dazu wurden dieselben Zelllinien in immundefiziente Rag1^{-/-}-Mäuse injiziert und deren Wachstumsverhalten *in vivo* untersucht. In den Rag1^{-/-}-Mäusen zeigen die LDHA-herunterregulierenden Klone keine nennenswerten Wachstumsdifferenzen im Vergleich zu den Kontrollen, wie auch schon *in vitro* beobachtet. Die genetisch veränderten murinen Zelllinien wurden auch in immunkompetente C57/BL6-Mäuse mit verschiedenen Zelldichten injiziert. Dabei konnte bei allen Zelldichten beobachtet werden, dass die Kontrollzellen wesentlich größere Tumore bildeten als die LDHA-herunterregulierenden Tumorzellen. Zudem war die Tumoranwachsrates in niedrigen Zelldichten bei den wenig Laktat sezernierenden Klonen im Vergleich zu den Kontrollen deutlich geringer als in hohen Zelldichten. Dies könnte bedeuten, dass die verringerte Laktatsekretion starke Auswirkungen auf T-Zellen hat und somit das Tumorwachstum in der immunkompetenten Maus kontrolliert.

Diese Experimente in immunkompetenten und immundefizienten Mäusen deuten auf einen immunsuppressiven Effekt des Laktats *in vivo* hin. Veränderungen im Stoffwechsel von Tumoren werden momentan hauptsächlich diagnostisch genutzt, bieten aber in Zukunft interessante Ansätze zur Therapieentwicklung. Besonders der Glukosemetabolismus stellt hier ein interessantes Ziel für die Entwicklung von Kombinationstherapien, zusammen mit Strahlen-, Chemo-, oder Vaccinierungstherapien, dar.

8 Summary and conclusions

Dysregulated metabolic pathways are typical for tumors. Especially the glucose metabolism is altered in many tumor entities, a finding that was described many years ago by Otto Warburg. The accelerated glycolysis leads to an accumulation of lactate in the tumor environment which is associated with a bad prognosis. This may in part be due to the fact that lactate modulates the maturation and activation of immune cells, which could be shown by our group. One aim of this investigation was to analyze dysregulated metabolic pathways in tumor cell lines and primary tumors compared to normal cells. In addition, corresponding metabolites should be determined in cell culture supernatants.

Several tumor cell lines of different origins were analyzed by RT-qPCR. Regarding the lipid metabolism, we analyzed COX1 and COX2. The results did not show any significant differences between tumor cells and untransformed cells. Especially COX2 was highly expressed not only in tumor cells but also in primary human monocytes. This might indicate that not only the tumor cells themselves, but also infiltrating immune cells are responsible for the overexpression of COX2 in tumors. Furthermore, we found that important enzymes of the amino acid metabolism like IDO1, iNOS as well as ARG2 were also strongly expressed in immune cells. The strongest differences in gene expression were detected in genes related to the glucose metabolism. LDHA and GLUT1 mRNA-expression were significantly upregulated in tumor cell lines and an increased lactate secretion of the tumor cell lines compared to normal cells was determined. High rates of glycolysis were not linked to low oxygen consumption as most of the analyzed tumor cell lines clearly consumed oxygen. The high expression of the PDH and the MDH on mRNA-level confirmed the mitochondrial activity of the analyzed tumor cell lines. This indicates that a high glycolysis rate does not always correlate with a low respiration in tumors. Because tumor cell lines present only a model system for primary tumors, the metabolic profile of different primary tumors was analyzed next. Tumor biopsies of different origins were used and compared with the corresponding normal tissue of the same patient. Analyses of renal cell carcinoma (RCC) biopsies confirmed our cell culture data as LDHA, GLUT1 and MCT1 were overexpressed on mRNA- and protein-level

in the tumor tissue. In contrast, LDHB was lower expressed in the tumor tissue. In addition, we could show that high GLUT1 expression correlated with a low infiltration of CD8⁺ T-cells in RCC biopsies. Beside a high expression of genes involved in glycolysis, IDO1 was also overexpressed in the RCC biopsies compared to normal renal tissue. No differences were found regarding COX1/2 and ARG1/iNOS expression.

We also analyzed some urothelial carcinoma and hepatocellular carcinoma biopsies and found a trend for a higher GLUT1 expression in hepatocellular carcinoma and increased LDHA expression in urothelial carcinoma. This indicates that the Warburg-phenotype is less pronounced in certain tumors.

Next we analyzed the impact of pharmacologic as well as genetic inhibition of glycolysis on tumor growth *in vitro* and *in vivo*. Pharmacologic suppression of glycolysis by 2-DG and other inhibitors severely inhibited tumor cell proliferation *in vitro* and we could demonstrate a synergistic effect of dexamethasone and 2-DG. LDHA was also downregulated by means of shRNA technology in the human melanoma cell line Melm and in the murine melanoma cell line B16.SIY E12. The downregulation of LDHA led to a decrease in lactate secretion but had no significant effect on tumor growth *in vitro*. In immunodeficient Rag1^{-/-}-mice, lacking B-lymphocytes and T-lymphocytes, LDHA low expressing clones did also show no differences in tumor growth. However, injection into immunocompetent C57/BL6-mice resulted in an impaired growth of LDHA low expressing tumor cells. In addition, tumor take of these clones was lower compared to the control clones. This indicates that the tumor metabolism/lactate secretion influences the activity of T-cells and thereby controls tumor growth in the immunocompetent mouse.

Up to now, alterations in the tumor metabolism are primarily used for diagnostic purposes. In the future these differences may offer interesting possibilities for the development of therapies. Especially the glucose metabolism is an interesting target for tumor therapy together with radiation, chemo- or immunotherapies.

9 Literaturverzeichnis

- [1] AIRLEY, R., LONCASTER, J., DAVIDSON, S., BROMLEY, M., ROBERTS, S., PATTERSON, A., HUNTER, R., STRATFORD, I., AND WEST, C. Glucose transporter glut-1 expression correlates with tumor hypoxia and predicts metastasis-free survival in advanced carcinoma of the cervix. *Clin Cancer Res* 7, 4 (Apr. 2001), 928–34.
- [2] AIRLEY, R. E., AND MOBASHERI, A. Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics. *Chemotherapy* 53, 4 (2007), 233–56.
- [3] ALEDO, J. C., SEGURA, J. A., MEDINA, M. A., ALONSO, F. J., NÚÑEZ DE CASTRO, I., AND MÁRQUEZ, J. Phosphate-activated glutaminase expression during tumor development. *FEBS Lett* 341, 1 (Mar. 1994), 39–42.
- [4] AMANN, T., MAEGDEFRAU, U., HARTMANN, A., AGAIMY, A., MARIENHAGEN, J., WEISS, T. S., STOELTZING, O., WARNECKE, C., SCHÖLMERICH, J., OEFNER, P. J., KREUTZ, M., BOSSERHOFF, A. K., AND HELLERBRAND, C. Glut1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis. *Am J Pathol* 174, 4 (Apr. 2009), 1544–52.
- [5] ATTIGA, F. A., FERNANDEZ, P. M., WEERARATNA, A. T., MANYAK, M. J., AND PATIERNO, S. R. Inhibitors of prostaglandin synthesis inhibit human prostate tumor cell invasiveness and reduce the release of matrix metalloproteinases. *Cancer Res* 60, 16 (Aug. 2000), 4629–37.
- [6] BAUMANN, F., LEUKEL, P., DOERFELT, A., BEIER, C. P., DETTMER, K., OEFNER, P. J., KASTENBERGER, M., KREUTZ, M., NICKL-JOCKSCHAT, T., BOGDAHN, U., BOSSERHOFF, A.-K., AND HAU, P. Lactate promotes glioma migration by tgfbeta2-dependent regulation of matrix metalloproteinase-2. *Neuro Oncol* 11, 4 (Aug. 2009), 368–80.

- [7] BECKER, M. R., SIEGELIN, M. D., ROMPEL, R., ENK, A. H., AND GAISER, T. Cox-2 expression in malignant melanoma: a novel prognostic marker? *Melanoma Res* 19, 1 (Feb. 2009), 8–16.
- [8] BHARDWAJ, V., RIZVI, N., LAI, M. B., LAI, J. C. K., AND BHUSHAN, A. Glycolytic enzyme inhibitors affect pancreatic cancer survival by modulating its signaling and energetics. *Anticancer Res* 30, 3 (Mar. 2010), 743–9.
- [9] BONNET, S., ARCHER, S. L., ALLALUNIS-TURNER, J., HAROMY, A., BEAULIEU, C., THOMPSON, R., LEE, C. T., LOPASCHUK, G. D., PUTTAGUNTA, L., BONNET, S., HARRY, G., HASHIMOTO, K., PORTER, C. J., ANDRADE, M. A., THEBAUD, B., AND MICHELAKIS, E. D. A mitochondria-k⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell* 11, 1 (Jan. 2007), 37–51.
- [10] BRANDACHER, G., PERATHONER, A., LADURNER, R., SCHNEEBERGER, S., OBRIST, P., WINKLER, C., WERNER, E. R., WERNER-FELMAYER, G., WEISS, H. G., GÖBEL, G., MARGREITER, R., KÖNIGSRÄINER, A., FUCHS, D., AND AMBERGER, A. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating t cells. *Clin Cancer Res* 12, 4 (Feb. 2006), 1144–51.
- [11] BRONTE, V., KASIC, T., GRI, G., GALLANA, K., BORSELLINO, G., MARIGO, I., BATTISTINI, L., IAFRATE, M., PRAYER-GALETTI, T., PAGANO, F., AND VIOLA, A. Boosting antitumor responses of t lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *J Exp Med* 201, 8 (Apr. 2005), 1257–68.
- [12] BUBENDORF, L. High-throughput microarray technologies: from genomics to clinics. *Eur Urol* 40, 2 (Aug. 2001), 231–8.
- [13] BURT, B. M., HUMM, J. L., KOOBY, D. A., SQUIRE, O. D., MASTORIDES, S., LARSON, S. M., AND FONG, Y. Using positron emission tomography with ¹⁸Fdg to predict tumor behavior in experimental colorectal cancer. *Neoplasia* 3, 3 (2001), 189–95.
- [14] CAY, O., RADNELL, M., JEPPSSON, B., AHRÉN, B., AND BENGMARK, S. Inhibitory effect of 2-deoxy-d-glucose on liver tumor growth in rats. *Cancer Res* 52, 20 (Oct. 1992), 5794–6.

- [15] CHAM, C. M., AND GAJEWSKI, T. F. Glucose availability regulates ifn-gamma production and p70s6 kinase activation in cd8+ effector t cells. *J Immunol* 174, 8 (Apr. 2005), 4670–7.
- [16] CHEN, K., LIU, Q., XIE, L., SHARP, P. A., AND WANG, D. I. Engineering of a mammalian cell line for reduction of lactate formation and high monoclonal antibody production. *Biotechnol Bioeng* 72, 1 (Jan. 2001), 55–61.
- [17] CHRISTOFK, H. R., VANDER HEIDEN, M. G., HARRIS, M. H., RAMANATHAN, A., GERSZTEN, R. E., WEI, R., FLEMING, M. D., SCHREIBER, S. L., AND CANTLEY, L. C. The m2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452, 7184 (Mar. 2008), 230–3.
- [18] CHUNG, D. J., ROSSI, M., ROMANO, E., GHITH, J., YUAN, J., MUNN, D. H., AND YOUNG, J. W. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing mature human monocyte-derived dendritic cells expand potent autologous regulatory t cells. *Blood* 114, 3 (July 2009), 555–63.
- [19] CLIMENT, F., ROSET, F., REPISO, A., AND PÉREZ DE LA OSSA, P. Red cell glycolytic enzyme disorders caused by mutations: an update. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 9, 2 (June 2009), 95–106.
- [20] DANG, C. V., LE, A., AND GAO, P. Myc-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clin Cancer Res* 15, 21 (Nov. 2009), 6479–83.
- [21] DASKALOW, K., PFANDER, D., WEICHERT, W., ROHWER, N., THELEN, A., NEUHAUS, P., JONAS, S., WIEDENMANN, B., BENCKERT, C., AND CRAMER, T. Distinct temporospatial expression patterns of glycolysis-related proteins in human hepatocellular carcinoma. *Histochem Cell Biol* 132, 1 (July 2009), 21–31.
- [22] DE SOUSA, M. S. A., LATINI, F. R. M., MONTEIRO, H. P., AND CERUTTI, J. M. Arginase 2 and nitric oxide synthase: Pathways associated with the pathogenesis of thyroid tumors. *Free Radic Biol Med* (June 2010).
- [23] DEBERARDINIS, R. J., AND CHENG, T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* 29, 3 (Jan. 2010), 313–24.
- [24] DEBERARDINIS, R. J., LUM, J. J., HATZIVASSILIOU, G., AND THOMPSON, C. B. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7, 1 (Jan. 2008), 11–20.

- [25] DEBERARDINIS, R. J., MANCUSO, A., DAIKHIN, E., NISSIM, I., YUDKOFF, M., WEHRLI, S., AND THOMPSON, C. B. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 49 (Dec. 2007), 19345–50.
- [26] DEININGER, M., BUCHDUNGER, E., AND DRUKER, B. J. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 105, 7 (Apr. 2005), 2640–53.
- [27] DEL BUFALO, D., CIUFFREDA, L., TRISCIUOGGIO, D., DESIDERI, M., COGNETTI, F., ZUPI, G., AND MILELLA, M. Antiangiogenic potential of the mammalian target of rapamycin inhibitor temsirolimus. *Cancer Res* 66, 11 (June 2006), 5549–54.
- [28] DIETL, K., RENNER, K., DETTMER, K., TIMISCHL, B., EBERHART, K., DORN, C., HELLERBRAND, C., KASTENBERGER, M., KUNZ-SCHUGHART, L. A., OEFNER, P. J., ANDREESSEN, R., GOTTFRIED, E., AND KREUTZ, M. P. Lactic acid and acidification inhibit tnfr secretion and glycolysis of human monocytes. *J Immunol* 184, 3 (Feb. 2010), 1200–9.
- [29] DOUVDEVANI, A., RAPOPORT, J., KONFORTI, A., ZLOTNIK, M., AND CHAIMOVITZ, C. The effect of peritoneal dialysis fluid on the release of il-1 beta and tnfr alpha by macrophages/monocytes. *Perit Dial Int* 13, 2 (1993), 112–7.
- [30] DOWNWARD, J. Targeting ras signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 1 (Jan. 2003), 11–22.
- [31] DRÖGE, W., ECK, H. P., BETZLER, M., AND NÄHER, H. Elevated plasma glutamate levels in colorectal carcinoma patients and in patients with acquired immunodeficiency syndrome (aids). *Immunobiology* 174, 4-5 (Aug. 1987), 473–9.
- [32] EBERHART, K., RENNER, K., RITTER, I., KASTENBERGER, M., SINGER, K., HELLERBRAND, C., KREUTZ, M., KOFLER, R., AND OEFNER, P. J. Low doses of 2-deoxyglucose sensitize acute lymphoblastic leukemia cells to glucocorticoid-induced apoptosis. *Leukemia* 23, 11 (Nov. 2009), 2167–70.
- [33] EICHHOFF, O. M., ZIPSER, M. C., XU, M., WEERARATNA, A. T., MIHIC, D., DUMMER, R., AND HOEK, K. S. The immunohistochemistry of invasive and proliferative phenotype switching in melanoma: a case report. *Melanoma Res* 20, 4 (Aug. 2010), 349–55.

- [34] ELSTROM, R. L., BAUER, D. E., BUZZAI, M., KARNAUSKAS, R., HARRIS, M. H., PLAS, D. R., ZHUANG, H., CINALLI, R. M., ALAVI, A., RUDIN, C. M., AND THOMPSON, C. B. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* 64, 11 (June 2004), 3892–9.
- [35] FANTIN, V. R., ST-PIERRE, J., AND LEDER, P. Attenuation of ldh-a expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9, 6 (June 2006), 425–34.
- [36] FISCHER, K., HOFFMANN, P., VOELKL, S., MEIDENBAUER, N., AMMER, J., EDINGER, M., GOTTFRIED, E., SCHWARZ, S., ROTHE, G., HOVES, S., RENNER, K., TIMISCHL, B., MACKENSEN, A., KUNZ-SCHUGHART, L., ANDREESSEN, R., KRAUSE, S. W., AND KREUTZ, M. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human t cells. *Blood* 109, 9 (May 2007), 3812–9.
- [37] FIUME, L., MANERBA, M., VETTRAINO, M., AND DI STEFANO, G. Impairment of aerobic glycolysis by inhibitors of lactic dehydrogenase hinders the growth of human hepatocellular carcinoma cell lines. *Pharmacology* 86, 3 (Aug. 2010), 157–162.
- [38] GIANNOULAKI, E. E., KALPAXIS, D. L., TENTAS, C., AND FESSAS, P. Lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in sera of patients with malignant diseases. *Clin Chem* 35, 3 (Mar. 1989), 396–9.
- [39] GOTTFRIED, E., KREUTZ, M., AND MACKENSEN, A. Tumor-induced modulation of dendritic cell function. *Cytokine Growth Factor Rev* 19, 1 (Feb. 2008), 65–77.
- [40] GOTTFRIED, E., KUNZ-SCHUGHART, L. A., EBNER, S., MUELLER-KLIESER, W., HOVES, S., ANDREESSEN, R., MACKENSEN, A., AND KREUTZ, M. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood* 107, 5 (Mar. 2006), 2013–21.
- [41] GOTTFRIED, E., KUNZ-SCHUGHART, L. A., WEBER, A., REHLI, M., PEUKER, A., MÜLLER, A., KASTENBERGER, M., BROCKHOFF, G., ANDREESSEN, R., AND KREUTZ, M. Expression of cd68 in non-myeloid cell types. *Scand J Immunol* 67, 5 (May 2008), 453–63.

- [42] GOTTSCHALK, S., ANDERSON, N., HAINZ, C., ECKHARDT, S. G., AND SERKOVA, N. J. Imatinib (sti571)-mediated changes in glucose metabolism in human leukemia bcr-abl-positive cells. *Clin Cancer Res* 10, 19 (Oct. 2004), 6661–8.
- [43] HALESTRAP, A. P., AND PRICE, N. T. The proton-linked monocarboxylate transporter (mct) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 343 Pt 2 (Oct. 1999), 281–99.
- [44] HAMILTON, E., FENNELL, M., AND STAFFORD, D. M. Modification of tumour glucose metabolism for therapeutic benefit. *Acta Oncol* 34, 3 (1995), 429–33.
- [45] HEIDEN, M. G. V., CANTLEY, L. C., AND THOMPSON, C. B. Understanding the warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 5930 (May 2009), 1029–1033.
- [46] HEIM, D. Tyrosin kinase inhibitors for the treatment of cml. *Ther Umsch* 63, 4 (Apr. 2006), 249–54.
- [47] HUDSON, C. C., LIU, M., CHIANG, G. G., OTTERNESS, D. M., LOOMIS, D. C., KAPER, F., GIACCIA, A. J., AND ABRAHAM, R. T. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* 22, 20 (Oct. 2002), 7004–14.
- [48] IACOPETTA, B., RUSSO, A., BAZAN, V., DARDANONI, G., GEBBIA, N., SOUSSI, T., KERR, D., ELSALEH, H., SOONG, R., KANDIOLER, D., JANSCHKE, E., KAPPEL, S., LUNG, M., LEUNG, C. S., KO, J. M., YUEN, S., HO, J., LEUNG, S. Y., CRAPEZ, E., DUFFOUR, J., YCHOU, M., LEAHY, D. T., O'DONOGHUE, D. P., AGNESE, V., CASCIO, S., DI FEDE, G., CHIECO-BIANCHI, L., BERTORELLE, R., BELLUCO, C., GIARETTI, W., CASTAGNOLA, P., RICEVUTO, E., FICORELLA, C., BOSARI, S., ARIZZI, C. D., MIYAKI, M., ONDA, M., KAMPMAN, E., DIERGAARDE, B., ROYDS, J., LOTHE, R. A., DIEP, C. B., MELING, G. I., OSTROWSKI, J., TRZECIAK, L., GUZINSKA-USTYMOWICZ, K., ZALEWSKI, B., CAPELLA, G. M., MORENO, V., PEINADO, M. A., LONNROTH, C., LUNDHOLM, K., SUN, X. F., JANSSON, A., BOUZOURENE, H., HSIEH, L. L., TANG, R., SMITH, D. R., ALLEN-MERSH, T. G., KHAN, Z. A., SHORTHOUSE, A. J., SILVERMAN, M. L., KATO, S., AND ISHIOKA, C. Functional categories of TP53 mutation in colorectal cancer: results of an International Collaborative Study. *Ann. Oncol.* 17 (May 2006), 842–847.

- [49] INABA, H., AND PUI, C.-H. Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* (Oct. 2010).
- [50] ISAACS, J. S., JUNG, Y. J., MOLE, D. R., LEE, S., TORRES-CABALA, C., CHUNG, Y.-L., MERINO, M., TREPEL, J., ZBAR, B., TORO, J., RATCLIFFE, P. J., LINEHAN, W. M., AND NECKERS, L. Hif overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of hif stability. *Cancer Cell* 8, 2 (Aug. 2005), 143–53.
- [51] JIN, G., ZHANG, T., WANG, T., AND PING YANG, L. Inhibition of alpha-interferon and cinnamic acid on proliferation of human lung cancer cell. *Ai Zheng* 21, 8 (Aug. 2002), 860–2.
- [52] KANDIOLER, D., FOEDINGER, M., MUELLER, M. R., ECKERSBERGER, F., MANNHALTER, C., AND WOLNER, E. Carcinogen-specific mutations in the p53 tumor suppressor gene in lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 107, 4 (Apr. 1994), 1095–8.
- [53] KANDIOLER-ECKERSBERGER, D., LUDWIG, C., RUDAS, M., KAPPEL, S., JANSCHKE, E., WENZEL, C., SCHLAGBAUER-WADL, H., MITTLBÖCK, M., GNANT, M., STEGER, G., AND JAKESZ, R. Tp53 mutation and p53 overexpression for prediction of response to neoadjuvant treatment in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 6, 1 (Jan. 2000), 50–6.
- [54] KAPOOR, A. Inhibition of mtor in kidney cancer. *Curr Oncol* 16 Suppl 1 (May 2009), S33–9.
- [55] KATZ, J. B., MULLER, A. J., AND PRENDERGAST, G. C. Indoleamine 2,3-dioxygenase in t-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunol Rev* 222 (Apr. 2008), 206–21.
- [56] KIEBISH, M. A., HAN, X., CHENG, H., CHUANG, J. H., AND SEYFRIED, T. N. Cardiolipin and electron transport chain abnormalities in mouse brain tumor mitochondria: lipidomic evidence supporting the warburg theory of cancer. *J Lipid Res* 49, 12 (Dec. 2008), 2545–56.
- [57] KIM, S. H., AND LEE, G. M. Down-regulation of lactate dehydrogenase-a by sirnas for reduced lactic acid formation of chinese hamster ovary cells producing thrombopoietin. *Appl Microbiol Biotechnol* 74, 1 (Feb. 2007), 152–9.

- [58] KONUR, A., KRAUSE, S. W., REHLI, M., KREUTZ, M., AND ANDREESEN, R. Human monocytes induce a carcinoma cell line to secrete high amounts of nitric oxide. *J Immunol* 157, 5 (Sept. 1996), 2109–15.
- [59] KOONTONGKAEW, S., MONTHANAPISUT, P., AND SAENSUK, T. Inhibition of arachidonic acid metabolism decreases tumor cell invasion and matrix metalloproteinase expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (July 2010).
- [60] KOUKOURAKIS, M. I., GIATROMANOLAKI, A., BOUGIOUKAS, G., AND SIVRIDIS, E. Lung cancer: a comparative study of metabolism related protein expression in cancer cells and tumor associated stroma. *Cancer Biol Ther* 6, 9 (Sept. 2007), 1476–9.
- [61] KOUKOURAKIS, M. I., GIATROMANOLAKI, A., HARRIS, A. L., AND SIVRIDIS, E. Comparison of metabolic pathways between cancer cells and stromal cells in colorectal carcinomas: a metabolic survival role for tumor-associated stroma. *Cancer Res* 66, 2 (Jan. 2006), 632–7.
- [62] KOUKOURAKIS, M. I., GIATROMANOLAKI, A., SIVRIDIS, E., BOUGIOUKAS, G., DIDILIS, V., GATTER, K. C., AND HARRIS, A. L. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *Br. J. Cancer* 89 (Sep 2003), 877–885.
- [63] KOUKOURAKIS, M. I., GIATROMANOLAKI, A., SIVRIDIS, E., GATTER, K. C., AND HARRIS, A. L. Lactate dehydrogenase 5 expression in operable colorectal cancer: strong association with survival and activated vascular endothelial growth factor pathway—a report of the Tumour Angiogenesis Research Group. *J. Clin. Oncol.* 24 (Sep 2006), 4301–4308.
- [64] KOUKOURAKIS, M. I., KONTOMANOLIS, E., GIATROMANOLAKI, A., SIVRIDIS, E., AND LIBERIS, V. Serum and tissue ldh levels in patients with breast/gynaecological cancer and benign diseases. *Gynecol Obstet Invest* 67, 3 (2009), 162–8.
- [65] KUNKEL, M., REICHERT, T. E., BENZ, P., LEHR, H.-A., JEONG, J.-H., WIEAND, S., BARTENSTEIN, P., WAGNER, W., AND WHITESIDE, T. L. Overexpression of glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 97, 4 (Feb. 2003), 1015–24.
- [66] LACROIX, M., TOILLON, R.-A., AND LECLERCQ, G. p53 and breast cancer, an update. *Endocr Relat Cancer* 13, 2 (June 2006), 293–325.

- [67] LANGBEIN, S., ZERILLI, M., ZUR HAUSEN, A., STAIGER, W., RENSCH-BOSCHERT, K., LUKAN, N., POPA, J., TERNULLO, M. P., STEIDLER, A., WEISS, C., GROBHOLZ, R., WILLEKE, F., ALKEN, P., STASSI, G., SCHUBERT, P., AND COY, J. F. Expression of transketolase tktl1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted. *Br J Cancer* 94, 4 (Feb. 2006), 578–85.
- [68] LARKINS, T. L., NOWELL, M., SINGH, S., AND SANFORD, G. L. Inhibition of cyclooxygenase-2 decreases breast cancer cell motility, invasion and matrix metalloproteinase expression. *BMC Cancer* 6 (2006), 181.
- [69] LE, A., COOPER, C. R., GOUW, A. M., DINAVAH, R., MAITRA, A., DECK, L. M., ROYER, R. E., VANDER JAGT, D. L., SEMENZA, G. L., AND DANG, C. V. Inhibition of lactate dehydrogenase a induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 5 (Feb. 2010), 2037–42.
- [70] LEE, S. Y., CHOI, H. K., LEE, K. J., JUNG, J. Y., HUR, G. Y., JUNG, K. H., KIM, J. H., SHIN, C., SHIM, J. J., IN, K. H., KANG, K. H., AND YOO, S. H. The immune tolerance of cancer is mediated by ido that is inhibited by cox-2 inhibitors through regulatory t cells. *J Immunother* 32, 1 (Jan. 2009), 22–8.
- [71] LI, S. S., FITCH, W. M., PAN, Y. C., AND SHARIEF, F. S. Evolutionary relationships of vertebrate lactate dehydrogenase isozymes a4 (muscle), b4 (heart), and c4 (testis). *J Biol Chem* 258, 11 (June 1983), 7029–32.
- [72] LIU, X., NEWTON, R. C., FRIEDMAN, S. M., AND SCHERLE, P. A. Indoleamine 2,3-dioxygenase, an emerging target for anti-cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 9, 8 (Dec. 2009), 938–52.
- [73] LÖB, S., KÖNIGSRÄINER, A., ZIEKER, D., BRÜCHER, B. L. D. M., RAMMENSEE, H.-G., OPELZ, G., AND TERNESS, P. Ido1 and ido2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. *Cancer Immunol Immunother* 58, 1 (Jan. 2009), 153–7.
- [74] MADHOK, B. M., YELURI, S., PERRY, S. L., HUGHES, T. A., AND JAYNE, D. G. Dichloroacetate induces apoptosis and cell-cycle arrest in colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 102, 12 (June 2010), 1746–52.

- [75] MASCHEK, G., SAVARAJ, N., PRIEBE, W., BRAUNSCHWEIGER, P., HAMILTON, K., TIDMARSH, G. F., DE YOUNG, L. R., AND LAMPIDIS, T. J. 2-deoxy-d-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo. *Cancer Res* 64, 1 (Jan. 2004), 31–4.
- [76] MATHUPALA, S. P., HEESE, C., AND PEDERSEN, P. L. Glucose catabolism in cancer cells. the type ii hexokinase promoter contains functionally active response elements for the tumor suppressor p53. *J Biol Chem* 272, 36 (Sept. 1997), 22776–80.
- [77] MATOBA, S., KANG, J.-G., PATINO, W. D., WRAGG, A., BOEHM, M., GAVRILOVA, O., HURLEY, P. J., BUNZ, F., AND HWANG, P. M. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312, 5780 (June 2006), 1650–3.
- [78] MAZAN-MAMCZARZ, K., HAGNER, P., DAI, B., CORL, S., LIU, Z., AND GARTENHAUS, R. B. Targeted suppression of mct-1 attenuates the malignant phenotype through a translational mechanism. *Leuk Res* 33, 3 (Mar. 2009), 474–82.
- [79] MEYER, S., WILD, P. J., VOGT, T., BATAILLE, F., EHRET, C., GANTNER, S., LANDTHALER, M., KLINKHAMMER-SCHALKE, M., HOFSTAEDTER, F., AND BOSSERHOFF, A. K. Methylthioadenosine phosphorylase represents a predictive marker for response to adjuvant interferon therapy in patients with malignant melanoma. *Exp Dermatol* 19, 8 (Aug. 2010), e251–7.
- [80] MICHELAKIS, E. D., WEBSTER, L., AND MACKEY, J. R. Dichloroacetate (dca) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br J Cancer* 99, 7 (Oct. 2008), 989–94.
- [81] MUNN, D. H., SHARMA, M. D., LEE, J. R., JHAVER, K. G., JOHNSON, T. S., KESKIN, D. B., MARSHALL, B., CHANDLER, P., ANTONIA, S. J., BURGESS, R., SLINGLUFF, C. L., AND MELLOR, A. L. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 297, 5588 (Sept. 2002), 1867–70.
- [82] NOLOP, K. B., RHODES, C. G., BRUDIN, L. H., BEANEY, R. P., KRAUSZ, T., JONES, T., AND HUGHES, J. M. Glucose utilization in vivo by human pulmonary neoplasms. *Cancer* 60, 11 (Dec. 1987), 2682–9.
- [83] PACHECO, R., GALLART, T., LLUIS, C., AND FRANCO, R. Role of glutamate on t-cell mediated immunity. *J Neuroimmunol* 185, 1-2 (Apr. 2007), 9–19.

- [84] PALMIERI, D., FITZGERALD, D., SHREEVE, S. M., HUA, E., BRONDER, J. L., WEIL, R. J., DAVIS, S., STARK, A. M., MERINO, M. J., KUREK, R., MEHDORN, H. M., DAVIS, G., STEINBERG, S. M., MELTZER, P. S., ALDAPE, K., AND STEEG, P. S. Analyses of resected human brain metastases of breast cancer reveal the association between up-regulation of hexokinase 2 and poor prognosis. *Mol Cancer Res* 7, 9 (Sept. 2009), 1438–45.
- [85] PEDERSEN, P. L. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog Exp Tumor Res* 22 (1978), 190–274.
- [86] PELICANO, H., MARTIN, D. S., XU, R.-H., AND HUANG, P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene* 25, 34 (Aug. 2006), 4633–46.
- [87] PERANZONI, E., MARIGO, I., DOLCETTI, L., UGEL, S., SONDA, N., TASCHIN, E., MANTELLI, B., BRONTE, V., AND ZANOVELLO, P. Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology. *Immunobiology* 212, 9-10 (2007), 795–812.
- [88] POPOV, A., AND SCHULTZE, J. L. Ido-expressing regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection. *J Mol Med* 86, 2 (Feb. 2008), 145–60.
- [89] PRASANNA, V. K., VENKATARAMANA, N. K., DWARAKANATH, B. S., AND SANTHOSH, V. Differential responses of tumors and normal brain to the combined treatment of 2-dg and radiation in glioblastoma. *J Cancer Res Ther* 5 Suppl 1 (Sept. 2009), S44–7.
- [90] PUIG-KRÖGER, A., PELLO, O. M., SELGAS, R., CRIADO, G., BAJO, M.-A., SÁNCHEZ-TOMERO, J. A., ALVAREZ, V., DEL PESO, G., SÁNCHEZ-MATEOS, P., HOLMES, C., FAICT, D., LÓPEZ-CABRERA, M., MADRENAS, J., AND CORBÍ, A. L. Peritoneal dialysis solutions inhibit the differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: effect of lactate and glucose-degradation products. *J Leukoc Biol* 73, 4 (Apr. 2003), 482–92.
- [91] RADULOVIC, S., AND BJELOGRLIC, S. K. Sunitinib, sorafenib and mtor inhibitors in renal cancer. *J BUON* 12 Suppl 1 (Sept. 2007), S151–62.
- [92] RATCLIFFE, P. J. Fumarate hydratase deficiency and cancer: activation of hypoxia signaling? *Cancer Cell* 11, 4 (Apr. 2007), 303–5.
- [93] RIESENBERG, R., WEILER, C., SPRING, O., EDER, M., BUCHNER, A., POPP, T., CASTRO, M., KAMMERER, R., TAKIKAWA, O., HATZ, R. A., STIEF, C. G., HOF-

- TETTER, A., AND ZIMMERMANN, W. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor endothelial cells correlates with long-term survival of patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13, 23 (Dec. 2007), 6993–7002.
- [94] RODRIGUEZ, P. C., HERNANDEZ, C. P., QUICENO, D., DUBINETT, S. M., ZABALETA, J., OCHOA, J. B., GILBERT, J., AND OCHOA, A. C. Arginase i in myeloid suppressor cells is induced by cox-2 in lung carcinoma. *J Exp Med* 202, 7 (Oct. 2005), 931–9.
- [95] ROH, M. S., JEONG, J. S., KIM, Y. H., KIM, M. C., AND HONG, S. H. Diagnostic utility of glut1 in the differential diagnosis of liver carcinomas. *Hepatogastroenterology* 51, 59 (2004), 1315–8.
- [96] RUIZ HERNÁNDEZ, G., ROMERO DE AVILA Y AVALOS, C., AND CARRERAS DELGADO, J. L. The value of ^{18}f -fluoro-2-deoxy-d-glucose positron emission tomography (^{18}f -fdg pet) in diagnosis of neoplastic diseases. *Med Clin (Barc)* 124, 6 (Feb. 2005), 229–36.
- [97] RUTELLA, S., BONANNO, G., AND DE CRISTOFARO, R. Targeting indoleamine 2,3-dioxygenase (ido) to counteract tumour-induced immune dysfunction: from biochemistry to clinical development. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 9, 2 (June 2009), 151–77.
- [98] SÁNCHEZ-ARAGÓ, M., CHAMORRO, M., AND CUEZVA, J. M. Selection of cancer cells with repressed mitochondria triggers colon cancer progression. *Carcinogenesis* 31, 4 (Apr. 2010), 567–76.
- [99] SATTLER, U. G. A., WALENTA, S., AND MUELLER-KLIESER, W. Lactate and redox status in malignant tumors. *Anaesthesist* 56, 5 (May 2007), 466–9.
- [100] SCHNEIDER, F. Die aerobe Glykolyse der Tumorzelle. *Naturwissenschaften* 68 (Jan. 1981), 20–27.
- [101] SCHOENFELD, A. R., DAVIDOWITZ, E. J., AND BURK, R. D. Elongin bc complex prevents degradation of von hippel-lindau tumor suppressor gene products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 15 (July 2000), 8507–12.
- [102] SCHULZ, T. J., THIERBACH, R., VOIGT, A., DREWES, G., MIETZNER, B., STEINBERG, P., PFEIFFER, A. F. H., AND RISTOW, M. Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto warburg revisited. *J Biol Chem* 281, 2 (Jan. 2006), 977–81.

- [103] SELAK, M. A., ARMOUR, S. M., MACKENZIE, E. D., BOULAHBEL, H., WATSON, D. G., MANSFIELD, K. D., PAN, Y., SIMON, M. C., THOMPSON, C. B., AND GOTTLIEB, E. Succinate links tca cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting hif-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 7, 1 (Jan. 2005), 77–85.
- [104] SEMENZA, G. L. Hif-1 mediates the warburg effect in clear cell renal carcinoma., June 2007.
- [105] SHARMA, M. D., HOU, D.-Y., LIU, Y., KONI, P. A., METZ, R., CHANDLER, P., MELLOR, A. L., HE, Y., AND MUNN, D. H. Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of foxp3+ tregs to th17-like cells in tumor-draining lymph nodes. *Blood* 113, 24 (June 2009), 6102–11.
- [106] SHARMA, P. K., BHARDWAJ, R., DWARAKANATH, B. S., AND VARSHNEY, R. Metabolic oxidative stress induced by a combination of 2-dg and 6-an enhances radiation damage selectively in malignant cells via non-coordinated expression of antioxidant enzymes. *Cancer Lett* 295, 2 (Sept. 2010), 154–66.
- [107] SIEDLAR, M., MYTAR, B., KRZESZOWIAK, A., BARAN, J., HYSZKO, M., RUGGIERO, I., WIECKIEWICZ, J., STACHURA, J., AND ZEMBALA, M. Demonstration of inos-mrna and inos in human monocytes stimulated with cancer cells in vitro. *J Leukoc Biol* 65, 5 (May 1999), 597–604.
- [108] SINGER, K., KASTENBERGER, M., GOTTFRIED, E., HAMMERSCHMIED, C. G., BÜTTNER, M., AIGNER, M., SELIGER, B., WALTER, B., SCHLÖSSER, H., HARTMANN, A., ANDREESSEN, R., MACKENSEN, A., AND KREUTZ, M. Warburg phenotype in renal cell carcinoma: High expression of glucose-transporter 1 (glut-1) correlates with low cd8(+) t-cell infiltration in the tumor. *Int J Cancer* (July 2010).
- [109] SMITH, S. M., ANASTASI, J., COHEN, K. S., AND GODLEY, L. A. The impact of myc expression in lymphoma biology: Beyond burkitt lymphoma. *Blood Cells Mol Dis* (Sept. 2010).
- [110] SONVEAUX, P., VÉGRAN, F., SCHROEDER, T., WERGIN, M. C., VERRAX, J., RABANI, Z. N., DE SAEDELEER, C. J., KENNEDY, K. M., DIEPART, C., JORDAN, B. F., KELLEY, M. J., GALLEZ, B., WAHL, M. L., FERON, O., AND DEWHIRST, M. W. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest* 118, 12 (Dec. 2008), 3930–42.

- [111] STIEWE, T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 7, 3 (Mar. 2007), 165–8.
- [112] SUGANUMA, N., SEGADÉ, F., MATSUZU, K., AND BOWDEN, D. W. Differential expression of facilitative glucose transporters in normal and tumour kidney tissues., May 2007.
- [113] SUN, R. C., FADIA, M., DAHLSTROM, J. E., PARISH, C. R., BOARD, P. G., AND BLACKBURN, A. C. Reversal of the glycolytic phenotype by dichloroacetate inhibits metastatic breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res Treat* 120, 1 (Feb. 2010), 253–60.
- [114] SZAFIARSKA, A., BAJ-KRZYWORZEKA, M., SIEDLAR, M., WEGIARCZYK, K., RUGGIERO, I., HAJTO, B., AND ZEMBALA, M. Antitumor response of cd14+/cd16+ monocyte subpopulation. *Exp Hematol* 32, 8 (Aug. 2004), 748–55.
- [115] UNWIN, R. D., CRAVEN, R. A., HARNDEN, P., HANRAHAN, S., TOTTY, N., KNOWLES, M., EARDLEY, I., SELBY, P. J., AND BANKS, R. E. Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the warburg effect., Aug. 2003.
- [116] VON BERGWELT-BAILDON, M. S., POPOV, A., SARIC, T., CHEMNITZ, J., CLASSEN, S., STOFFEL, M. S., FIORE, F., ROTH, U., BEYER, M., DEBEY, S., WICKENHAUSER, C., HANISCH, F.-G., AND SCHULTZE, J. L. Cd25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin e2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of t-cell inhibition. *Blood* 108, 1 (July 2006), 228–37.
- [117] WAHL, M. L., OWEN, J. A., BURD, R., HERLANDS, R. A., NOGAMI, S. S., RODECK, U., BERD, D., LEEPER, D. B., AND OWEN, C. S. Regulation of intracellular ph in human melanoma: potential therapeutic implications. *Mol Cancer Ther* 1, 8 (June 2002), 617–28.
- [118] WALENTA, S., SALAMEH, A., LYNG, H., EVENSEN, J. F., MITZE, M., ROFSTAD, E. K., AND MUELLER-KLIESER, W. Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis. *Am J Pathol* 150, 2 (Feb. 1997), 409–15.
- [119] WALENTA, S., SCHROEDER, T., AND MUELLER-KLIESER, W. Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology. *Curr Med Chem* 11, 16 (Aug. 2004), 2195–204.

- [120] WALENTA, S., WETTERLING, M., LEHRKE, M., SCHWICKERT, G., SUNDFØR, K., ROFSTAD, E. K., AND MUELLER-KLIESER, W. High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res* 60, 4 (Feb. 2000), 916–21.
- [121] WARBURG, O. On the facultative anaerobiosis of cancer cells and its use in chemotherapy. *Munch Med Wochenschr* 103 (Dec. 1961), 2504–6.
- [122] WARNER, T. D., AND MITCHELL, J. A. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *FASEB J* 18, 7 (May 2004), 790–804.
- [123] WEI, L. H., SU, H., HILDEBRANDT, I. J., PHELPS, M. E., CZERNIN, J., AND WEBER, W. A. Changes in tumor metabolism as readout for mammalian target of rapamycin kinase inhibition by rapamycin in glioblastoma. *Clin Cancer Res* 14, 11 (June 2008), 3416–26.
- [124] WEINHOUSE, S. The warburg hypothesis fifty years later. *Z Krebsforsch Klin Onkol Cancer Res Clin Oncol* 87, 2 (1976), 115–26.
- [125] WISE, D. R., DEBERARDINIS, R. J., MANCUSO, A., SAYED, N., ZHANG, X.-Y., PFEIFFER, H. K., NISSIM, I., DAIKHIN, E., YUDKOFF, M., MCMAHON, S. B., AND THOMPSON, C. B. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 48 (Dec. 2008), 18782–7.
- [126] XIE, H., VALERA, V. A., MERINO, M. J., AMATO, A. M., SIGNORETTI, S., LINEHAN, W. M., SUKHATME, V. P., AND SETH, P. Ldh-a inhibition, a therapeutic strategy for treatment of hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer., Mar. 2009.
- [127] YUN, J., RAGO, C., CHEONG, I., PAGLIARINI, R., ANGENENDT, P., RAJAGOPALAN, H., SCHMIDT, K., WILLSON, J. K. V., MARKOWITZ, S., ZHOU, S., DIAZ, L. A., VELCULESCU, V. E., LENGAUER, C., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B., AND PAPADOPOULOS, N. Glucose deprivation contributes to the development of kras pathway mutations in tumor cells. *Science* 325, 5947 (Sept. 2009), 1555–9.
- [128] ZHANG, S., YUE, J. X., YANG, J. H., CAI, P. C., AND KONG, W. J. Overexpression of transketolase protein tktl1 is associated with occurrence and progression in nasopharyngeal carcinoma: a potential therapeutic target in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biol Ther* 7, 4 (Apr. 2008), 517–22.

- [129] ZHOU, M., ZHAO, Y., DING, Y., LIU, H., LIU, Z., FODSTAD, O., RIKER, A. I., KAMARAJUGADDA, S., LU, J., OWEN, L. B., LEDOUX, S. P., AND TAN, M. Warburg effect in chemosensitivity: targeting lactate dehydrogenase-a re-sensitizes taxol-resistant cancer cells to taxol. *Mol Cancer* 9 (2010), 33.

10 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
2-DG	2-Deoxy-D-Glukose
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ABL	<i>engl.</i> Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog
APS	Ammoniumpersulfat
ARG	Arginase
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	<i>engl.</i> breakpoint cluster region
BLAST	<i>engl.</i> Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BRAF	<i>engl.</i> v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BSA	Rinderserumalbumin (<i>engl.</i> bovine serum albumine)
Bq	Becquerel
CD	<i>engl.</i> cluster of differentiation
cDNA	<i>engl.</i> copy-DNA
Ci	Curie
CINN	α -Cyano-4-Hydroxycinnamat
C-JUN	<i>engl.</i> v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DEX	Dexamethason
DMEM	<i>engl.</i> Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> desoxyribonucleinacid)

Abkürzung	Beschreibung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (<i>engl.</i> enzyme linked immunosorbent assay)
ERK	<i>engl.</i> extracellular-signal regulated
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometrie (<i>engl.</i> fluorescence-activated-cell-sorting)
FCS	fötales Kälberserum (<i>engl.</i> fetal calve serum)
FDG-PET	¹⁸ F-Fluoro-2-Deoxy-D-Glukose-Positronen-Emissions-Tomographie
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FOS	<i>engl.</i> FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
FX11	3-Dihydroxy-6-Methyl-7-(Phenylmethyl)-4-Propylnaphthalen-1-Carboxylsäure
GFP	grünes fluoreszierendes Protein (<i>engl.</i> green fluorescent protein)
GLUT1	Glukosetransporter
³ H	Tritium
H ₂ O	Wasser
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCl	Salzsäure
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor (<i>engl.</i> hypoxia-inducible factor)
HK	Hexokinase
HRP	Meerettich-Peroxidase (<i>engl.</i> horseradish peroxidase)
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
kD	Kilodalton
KRAS	<i>engl.</i> Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LB	Luria Bertani
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysacharid

Abkürzung	Beschreibung
M	Molar
MAP	<i>engl.</i> mitogen-activated protein
MCT	Monocarboxylattransporter
MDH	Malatdehydrogenase
ml	Milliliter
M-MLV	<i>engl.</i> Moloney Murine Leukemia Virus
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	<i>engl.</i> messenger-RNA
mTOR	<i>engl.</i> mammalian target of rapamycin
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
n.k.	Negativkontrolle
O ₂	Sauerstoff
OD	optische Dichte
OxAc	Oxamsäure (<i>engl.</i> oxamic acid)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.</i> phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl.</i> polymerase-chain-reaction)
PDH	Pyruvatdehydrogenase
PI3K/AKT	Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B
PPP	Penthosephosphatweg
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RCC	Nierenzellkarzinom (<i>engl.</i> renal cell carcinoma)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	<i>engl.</i> Roswell Park Memorial Institut
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>engl.</i> rounds per minute)
RT-PCR	reverse-Transkriptase-PCR
RT-qPCR	quantitative PCR in Echtzeit (<i>engl.</i> realtime-quantitative PCR)

Abkürzung	Beschreibung
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>engl.</i> sodiumdodecylsulfate)
siRNA	<i>engl.</i> small interfering RNA
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetate/EDTA
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung (<i>engl.</i> tris buffered saline)
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TFG	transformierender Wachstumsfaktor (<i>engl.</i> transforming growth factor)
T _m	Schmelztemperatur
TMA	<i>engl.</i> Tissue microarray
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TOOS	N-Ethyl-N-(2hydroxy-3-sulfopropyl)m-toluidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>engl.</i> vascular endothelial growth factor)

Tabelle 10.1: **Abkürzungen**

11 Danksagung

Zu allererst bedanke ich mich ganz herzlich bei **Prof. Dr. Marina Kreutz** für die engagierte Betreuung meiner Doktorarbeit. Du hattest immer ein offenes Ohr für mich. Durch Deine ständige Diskussionsbereitschaft gingen mir immer wieder neue Lichter auf und ich ging mit einem „Aha“ aus der Besprechung. Vielen Dank für die schönen Kongresse in Innsbruck und Halle, an denen ich teilnehmen konnte. Aber auch unsere privaten Weihnachtsfeiern und Deine Geburtstagsfeiern waren immer für eine Überraschung gut.

Ganz besonders möchte ich **Prof. Dr. Otto Wolfbeis** von der naturwissenschaftlichen Fakultät IV Chemie und Pharmazie, für die bereitwillige Betreuung und Begutachtung meiner Doktorarbeit von Seiten der Universität Regensburg danken.

Mein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. med. Reinhard Andreesen**, der es mir ermöglichte diese Doktorarbeit am Institut für Hämatologie und Internistische Onkologie des Universitätsklinikums Regensburg anzufertigen. Vielen Dank auch für die grandiosen Weihnachtsfeiern und Betriebsausflüge.

Einen großen Dank möchte ich **Prof. Dr. Michael Rehli** aussprechen. In einigen meiner problematischen Experimente hattest Du die rettende Idee.

Einen gemeinsamen Dank an die eng zusammenarbeitenden **AGs Kreutz/Rehli**. Für die gemeinsamen Labor- und Literaturseminare, in denen ich meine eigenen Daten diskutieren, aber auch meinen wissenschaftlichen Horizont in anderen Fachrichtungen erweitern konnte. Ein großes Dankeschön an **Eva** für die intensive Unterstützung und Betreuung beim Besprechen meiner Daten und Ergebnisse. **Katrin**, meiner Promotionsmitstreiterin, danke ich für die tolle Zusammenarbeit und schöne Zeit im Labor, auf Kongressen und für die schönen Weinabende. Ein großes Lob auch an Alice, Gabi und Alex. **Alice**, danke für Deine Unterstützung in der Immunhistochemie. **Gabi**, vielen Dank für Deinen großen Einsatz und den FACSen die Du mit mir bis spät in die Nacht oder schon früh am Morgen während der oft langwierigen Mäuseversuche veranstaltet hast. Dabei möchte ich mich auch gleich bei **Dr. Gudrun Köhl, Anna, Anke und Bärbel** für die Betreuung meiner Mäuseversuche bedanken. **Alex**, vielen Dank für die Hilfe bei meinen Realplex-Marathons. Ich halte immer noch den Rekord mit 14 Platten an einem Tag. Yeah! **Rüdiger**, vielen Dank für das sortieren meiner manchmal sehr eigenwilligen Klone. Da mir jetzt keine Synonyme mehr für „Dankeschön“ einfallen, einfach vielen lieben Dank an: **Dr. Hang Thu Pham, Dr. Claudia Gebhard, Dr. Maja Klug, Lucia Schwarzfischer-Pfeilschifter, Dagmar Glatz, Ireen Ritter, Christian Schmidl, Julia Wegner, Monika Wehrstein, Martina Köhler, Sandra Vogl, Dr. Ute Schulz** und allen aus dem H1 die ich hoffentlich nicht vergessen habe. Wir hatten in der Arbeit aber auch privat immer viel Spaß miteinander. Solche Arbeitskollegen und Freunde kann man sich nur wünschen. Auf keinen Fall möchte ich unsere Alumni **Carole El-Chartouni, Monika Lichtinger, Tobias Weil und Elmar Schilling** vergessen. Tobi und Eddy, die Mensa-Crew wird immer dünner.

Wie immer kommt das Beste zum Schluss. Einen ganz großen Dank an **meine Eltern**, die mir, wie so vieles im Leben, mein Studium, ein Auslandssemester in Australien sowie diese Doktorarbeit ermöglicht und mich nicht nur in dieser Beziehung immer unterstützt haben.

Und mein allergrößter Dank gilt natürlich Dir **Kinga**, dafür dass Du mich besonders in den letzten Monaten ertragen hast und für noch so vieles mehr...♥

12 Curriculum Vitae

Michael Kastenberger

geboren am 31.12.1979 in Regensburg

Ausbildung

- Jan. 2007 - Okt. 2010 **Doktorarbeit** in der Abteilung für Hämatologie/Onkologie am Universitätsklinikum Regensburg (Leitung: Prof. Dr. Reinhard Andreesen), *Analyse und Modulation des Tumormetabolismus in humanen Tumorzelllinien und Tumorgeweben*, Betreuung: Prof. Dr. Marina Kreutz
- Mai 2006 - Jul. 2006 **Diplomarbeit** am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie der Universität Regensburg (Leitung: Prof. Dr. Stephan Schneuwly), *Molekulare und histologische Analyse der Neurodegenerationsmutante Vam*, Betreuung: Dr. José Botella-Munoz
- Sep. 2000 - Mär. 2006 **Studium der Biologie** an der Universität Regensburg, Schwerpunkte: Zell- und Entwicklungsbiologie, Genetik und medizinische Mikrobiologie
- Sep. 1999 - Mai. 2000 **Grundwehrdienst** im Gebirgspionierbataillon 8, Brannenburg
- Sep. 1998 - Jul. 1999 **Allgemeine Hochschulreife** am Johannes-Nepomuk-Gymnasium Rohr
- Sep. 1989 - Sep. 1998 **Gymnasium**, Donaugymnasium Kelheim

Berufserfahrung und Praktika

- Sep. 2006 - Okt. 2006 **Profos AG, Regensburg**, Tätigkeit: Klonierung, Reinigung und Mutagenese von Bindeproteinen gegen *E. coli* O157; Proteinstabilitätsmessungen, immunomagnetische Separation
- Apr. 2006 **Geneart AG, Regensburg**, Tätigkeit: Anzucht und Kultur von Mikroorganismen
- Apr. 2004 - Mai 2004 **Research School for Biological Science**, Australian National University, *Canberra, Australien*, Tätigkeit: Klonierungen für ein Gene-Silencing-Projekt in *D. melanogaster*, Betreuung: Prof. Dr. Robert Saint
- Apr. 2002 - Mai 2003 **Profos AG, Regensburg**, Tätigkeit: Entwicklung und Testung von Bakteriendetektionsverfahren

Sprachen

Deutsch	Muttersprache
Englisch	fließend
Französisch	Grundkenntnisse
Latein	Grundkenntnisse

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet. Weitere Personen waren an der inhaltlich materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Diese Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 3. November 2010,

Michael Kastenberger